

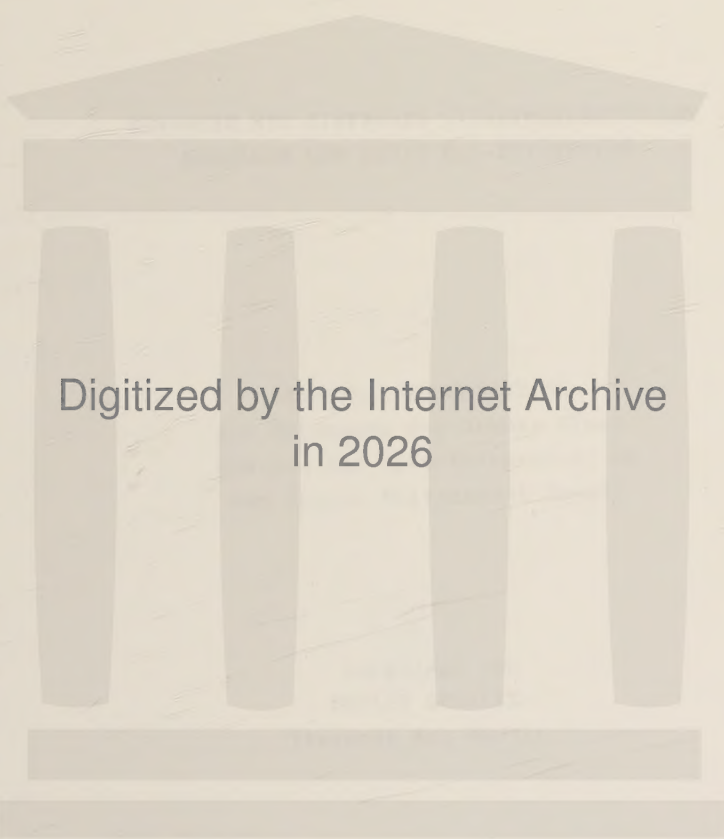
Aus dem Laboratorium für Pharmakologie und
Toxikologie am Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**VERSUCHE MIT EINFACHEN TIEREXPERIMENTELLEN
MODELLEN DER PETIT MAL-EPILEPSIEN**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin an
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
DETLEV SCHULTZ
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1983
Journal Nr. 1115



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546623_0024

Aus dem Laboratorium für Pharmakologie und
Toxikologie am Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

VERSUCHE MIT EINFACHEN TIEREXPERIMENTELLEN
MODELLEN DER PETIT MAL-EPILEPSIEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin an
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
DETLEV SCHULTZ
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1983

Journal Nr. 1115

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher:

Prof. Dr. F. Hörchner

Referent:

Prof. Dr. H.-H. Frey

Korreferent:

Prof. Dr. N.-C. Juhr



Tag der Promotion:

10. März 1983

1.	<u>EINLEITUNG</u>	5
2.	<u>LITERATUR</u>	7
2.1.	Einführung in die Epilepsie	7
2.1.1.	Definition Petit mal	7
2.1.2.	Klassifikation der epileptischen Anfälle	7
2.1.3.	Medikamentöse Behandlung der Epilepsien	8
2.2.	Ethosuximid, Valproinsäure und Diazepam	9
2.2.1.	Ethosuximid	9
2.2.2.	Valproinsäure	10
2.2.3.	Diazepam	11
2.3.	Krampfmodelle: durch Konvulsiva ausgelöste generalisierte Krämpfe	11
2.3.1.	Pentetrazol-Krampf	11
2.3.2.	Picrotoxin-Krampf	14
2.3.3.	Bicucullin	15
2.3.4.	3-Mercaptopropionsäure	16
2.3.5.	Allylglycin	17
2.3.6.	Methionin-Sulfoximin	18
2.3.7.	Fluoressigsäure	18
2.3.8.	2,4-Dimethylsulfolan	19
2.3.9.	Tetramethyldisulfotetramin	19
2.4.	Weitere Modelle	20
2.4.1.	Tottering-Mäuse	20
2.4.2.	Gerbils	21
2.4.3.	Pentetrazol-Kindling bei der Ratte	23
2.4.4.	Pentetrazol im Passive Avoidance Retention-Test	25
3.	<u>METHODEN</u>	28
3.1.	Tiermaterial	28
3.2.	Substanzen	29
3.3.	Statistik	30

	<u>Seite</u>
4. <u>ERGEBNISSE</u>	31
4.1. Krampfmodelle: durch Konvulsiva ausgelöste generalisierte Krämpfe	31
4.1.1. Pentetrazol-Krampf	31
4.1.2. Picrotoxin-Krampf	34
4.1.3. Bicucullin	36
4.1.4. 3-Mercaptopropionsäure	36
4.1.5. Allylglycin	37
4.1.6. Methionin-Sulfoximin	38
4.1.7. Fluoressigsäure	39
4.1.8. 2,4-Dimethylsulfolan	40
4.1.9. Tetramethylendisulfotetramin (TETS)	41
4.2. Weitere Modelle	42
4.2.1. Tottering-Mäuse	42
4.2.2. Gerbils	43
4.2.3. Pentetrazol-Kindling	45
4.2.3.1. Beobachtungen der Krampferscheinungen und deren Entwicklung	45
4.2.3.2. Einfluß von Ethosuximid und Valproat auf die Krampfentwicklung	47
4.2.3.3. Wirkung von Antiepileptika auf die Krampf- erscheinungen	48
4.2.3.4. Kindling-Versuche mit Mäusen	49
4.2.4. Passive Avoidance Retention-Test	49
5. <u>DISKUSSION</u>	54
6. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	61
7. <u>SUMMARY</u>	63
8. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	65

1. EINLEITUNG

Epilepsien sind relativ häufige Erkrankungen. Etwa 0,5 % aller Menschen sind von ihnen betroffen (MATTHES, 1977).

Trotz der großen Zahl der zur Verfügung stehenden Medikamente sind bis heute etwa 20 % aller Anfälle therapieresistent (MATTHES, 1977). Dies und die Tatsache, daß viele Medikamente zum Teil recht erhebliche unerwünschte Nebenwirkungen haben, machen eine Suche nach weiteren wirksamen Substanzen erforderlich.

Bei der Suche nach antikonvulsiv wirkenden Stoffen bedient man sich seit langem einer Reihe sogenannter Screening-Teste, das sind Teste, die mit relativ wenig Aufwand einen Hinweis auf das Vorliegen einer antikonvulsiven Wirkung geben. Durchgesetzt haben sich vor allen anderen der Maximale Elektrokampf-Test (MES) und der subkutane Pentetrazol-Krampf-Test (s.c.Pent.) am kleinen Versuchstier.

In der Regel zeichnen sich bei Grand mal-Epilepsien wirksame Stoffe durch Wirksamkeit im MES-Test aus und bei Petit mal-Epilepsien wirksame Stoffe im s.c.Pent.-Test (SWINYARD, 1969), jedoch ist die Aussagefähigkeit des s.c.Pent.-Tests für Anti-Petit mal-Aktivität geringer als die des MES-Tests für Anti-Grand mal-Aktivität (KRALL, 1978).

In den letzten Jahrzehnten sind viele Mäusestämme zunehmend resistent geworden gegen antikonvulsiv wirkende Stoffe. Dies äußert sich durch eine Steigerung der antikonvulsiv wirksamen Dosen (ED_{50}) um den Faktor 2 - 3 (FREY, 1981). Die dadurch bedingte zunehmende Unempfindlichkeit der Krampfmodelle macht eine Suche nach empfindlicheren und aussagekräftigeren Modellen für die Petit mal-Epilepsien erforderlich.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, eine Anzahl von Krampfmodellen mit Hilfe von klinisch bewährten Petit mal-Antiepileptika auf ihre Eignung als Screening-Modelle zur Auffindung

von bei Petit mal-Epilepsien wirksamen Substanzen zu untersuchen. Neben seit langem bekannten Krampfmodellen sollten einige in letzter Zeit beschriebene, bisher wenig erforschte Modelle untersucht werden, wobei sich die Auswahl auf einfache, schnell und ohne größeren Aufwand durchzuführende Krampfmodelle beschränkte.

2. LITERATUR

2.1. Einführung in die Epilepsie

2.1.1. Definition Petit mal

Der Begriff Petit mal wurde früher für jede Art kleiner epileptischer Anfälle benutzt. Heutzutage umfaßt der Begriff ausschließlich die primär generalisierten typischen Absenzen und den Petit mal-Myoklonus (GASTAUT, 1973).

2.1.2. Klassifikation der epileptischen Anfälle

Die zur Zeit von der Internationalen Liga gegen Epilepsie als verbindlich anerkannte Klassifikation geht auf GASTAUT (1969) zurück. Sie basiert auf klinischen und elektroenzephalographischen Anfallstypen.

Vier Hauptgruppen werden Unterschieden:

1. Partielle Anfälle
2. Generalisierte Anfälle
3. Unilaterale Anfälle
4. Unklassifizierte epileptische Anfälle

Die Partiellen Anfälle werden weiter unterteilt in:

A Partielle Anfälle mit einfachen Erscheinungen

- a) mit motorischen Symptomen
- b) mit besonderen sensorischen oder somato-sensorischen Symptomen
- c) mit autonomen Symptomen
- d) kombinierte Formen

B Partielle Anfälle mit komplexen Erscheinungen

- a) nur mit Bewußtseinsstörungen
- b) mit kognitiver Symptomatologie
- c) mit affektiver Symptomatik
- d) mit psychosensorischer Symptomatologie
- e) mit psychomotorischer Symptomatologie
- f) kombinierte Formen

C Sekundär generalisierte Partielle Anfälle

Die Generalisierten Anfälle werden weiter unterteilt in:

- a) Absenzen
 - i) einfache Absenzen
 - ii) komplexe Absenzen
- b) bilaterale massive epileptische Myokloni
(myoklonische Zuckungen)
- c) infantile Spasmen
- d) klonische Anfälle
- e) tonische Anfälle
- f) tonisch-klonische Anfälle (Grand mal-Anfälle)
- g) atonische Anfälle
- h) akinetische Anfälle

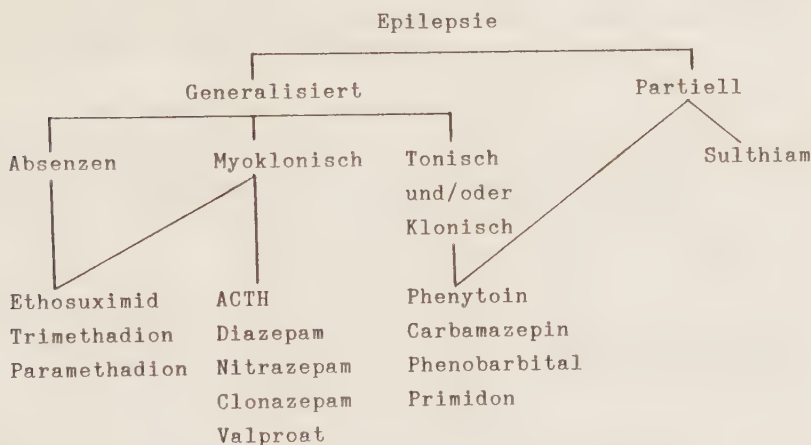
EADIE und TYRER (1980) unterteilen die generalisierten Anfälle in drei Hauptgruppen:

- A Absenzen
- B myoklonische und akinetische Anfälle
- C tonische, klonische und tonisch-klonische
(Grand mal) Anfälle

2.1.3. Medikamentöse Behandlung der Epilepsien

Die Wahl des Medikaments zur Behandlung der Epilepsien richtet sich nach dem Anfallstyp. Die Erfahrung hat gezeigt, daß bestimmte Formen der Epilepsie am besten auf bestimmte Antikonvulsiva reagieren (EADIE und TYRER, 1980).

Die folgende Tabelle nach EADIE und TYRER (1980) gibt einen Überblick über den Zusammenhang zwischen Anfallstyp und wirksamen Stoffen:



2.2. Ethosuximid, Valproinsäure und Diazepam

2.2.1. Ethosuximid

Ethosuximid ist ein wirksames Antiepilektikum bei der Behandlung von Absenzen und kann auch eingesetzt werden bei myoklonischen Anfällen generalisierter Epilepsie, besonders bei Formen erblichen Ursprungs. Ethosuximid ist unbrauchbar bei anderen Formen der Epilepsie (EADIE und TYRER, 1980). Ethosuximid ist das Mittel der Wahl bei der Behandlung von Absenzen (Petit mal), manche Formen der myoklonisch-astatischen Epilepsie sprechen ebenfalls darauf an. Es zeigt wenig oder gar keine Wirkung gegen generalisierte tonisch-klonische Anfälle und einfache oder komplexe partielle Anfälle (MATTHES, 1977; FERRENDELLI und KUPFERBERG, 1980).

FERRENDELLI und KUPFERBERG (1980) nehmen an, daß Ethosuximid seine Wirkung über eine Erhöhung der Chlorid-Conductance ent-

faltet, entweder direkt oder mit Hilfe eines inhibitorischen Neurotransmitters wie GABA. FROMM und KOHLI (1972) und FROMM et al. (1980) vermuten, daß Ethosuximid, wie andere Stoffe, die gegen Absenzen wirksam sind, über eine selektive Hemmung inhibitorischer Bahnen im ZNS wirkt, wobei angenommen wird, daß Absenzen durch paroxysmale Aktivität in inhibitorischen Bahnen verursacht werden.

EL-SAYED et al. (1978) stellten bei Mäusen nach der oralen Eingabe von 200 mg/kg Ethosuximid maximale Serumkonzentrationen nach wenigen Minuten fest. 74 % der Dosis wurden resorbiert. Die Halbwertszeit betrug etwa eine Stunde.

2.2.2. Valproinsäure

Valproinsäure ist neben Ethosuximid ein Mittel der ersten Wahl bei pyknoleptischen Absenzen und myoklonischen Anfällen (MATTHES, 1977), daneben besitzt es auch einen Anti-Grand mal-Effekt bei primär generalisierten Epilepsien. EADIE und TYRER (1980) beschreiben Valproinsäure als wirksam bei der Behandlung von Absenzen und generalisierten myoklonischen Anfällen. Auch soll es bei Fieberkrämpfen der Kleinkinder wirksam sein.

Valproinsäure wird in der Regel als Natriumsalz verabreicht.

Valproinsäure wirkt wahrscheinlich über eine Erhöhung der Konzentration des inhibitorischen Transmitters GABA im ZNS. Der Anstieg der GABA-Konzentration ist gut korreliert mit dem Beginn und der Dauer des antikonvulsiven Effekts (KUPFERBERG, 1980). LÜSCHER und ESENWEIN (1978) stellten nach oraler Eingabe von 200 bzw. 420 mg/kg Natriumvalproat bei Mäusen maximale Serumkonzentrationen nach 5 bzw. 10 Minuten fest. Nach der Gabe von 200 mg/kg wurden 47 % und nach der Gabe von 420 mg/kg 34 % resorbiert. Die Halbwertszeit betrug etwa 50 Minuten.

2.2.3. Diazepam

Diazepam wird heutzutage hauptsächlich als parenterales Antikonvulsivum verwendet. Bei oraler Verabreichung ist es wirksam bei der Behandlung von Absenzen und myoklonischen Anfällen (EADIE und TYRER, 1980).

Diazepam übt seine antikonvulsive Wirkung wahrscheinlich über GABAerge Mechanismen aus. Es gibt Hinweise, daß Diazepam die GABA-Freisetzung beeinflusst bzw. die Affinität von GABA zu den Rezeptoren erhöht (KILLAM und SURIA, 1980).

Bei Mäusen werden nach oraler Eingabe maximale Blutkonzentrationen innerhalb von 30 Minuten erreicht (MATTSON, 1972). COUTINHO et al. (1970) konnten höchste Blutkonzentrationen zwischen 5 Minuten und einer Stunde nach oraler Eingabe von Diazepam beobachten.

2.3. Krampfmodelle: Durch Konvulsiva ausgelöste generalisierte Krämpfe

2.3.1. Pentetrazol-Krampf

Der Pentetrazol-Krampf-Test ist eine schnelle Screening-Methode für die Beurteilung von antikonvulsiven Stoffen hinsichtlich ihrer potentiellen Brauchbarkeit bei der Behandlung von Epilepsien. Der Test mißt die Fähigkeit von Stoffen, Krämpfe zu unterdrücken, die durch Pentetrazol ausgelöst werden.

Dieser Test wird nicht nur als Standardverfahren für die Auffindung antikonvulsiv wirkender Stoffe eingesetzt, sondern auch als Modell der Petit mal-Epilepsien (WOODBURY, 1972).

Der subkutane Pentetrazol-Krampf-Test (s.c.Pent.) wird von SWINYARD et al. (1952), SWINYARD (1969) und KRALL et al. (1978) beschrieben. Bei Mäusen werden durch die subkutane Injektion von 85 mg/kg Pentetrazol, innerhalb eines Beobachtungszeitraumes

von 30 Minuten, bei etwa 97 % der Tiere klonische Zuckungen der Ohren, Kiefer und Vorderextremitäten ausgelöst. Der s.c.Pent.-Test mißt die Fähigkeit antikonvulsiver Stoffe sämtliche Krampferscheinungen, die durch die subkutane Injektion der CD₉₇ von Pentetrazol ausgelöst werden, zu verhindern. Pentetrazol wird zum Zeitpunkt der maximalen Wirkung der Antikonvulsiva verabreicht.

Als Kriterium für die konvulsive Wirkung von Pentetrazol geben STONE und JAVID (1979) generalisierte klonische oder tonisch-klonische Anfälle an, FREY und LÜSCHER (1976) und LÜSCHER und FREY (1977) generalisierte klonische Anfälle mit Verlust der Stellreflexe.

Gaben von Pentetrazol im Bereich der Krampfschwelle verursachen bei Tieren klonische Zuckungen der Vorderextremitäten und des Kiefers. Etwas höhere Dosen lösen generalisierte, asynchrone, klonische Bewegungen aus, die von einem tonischen Krampfanfall abgelöst werden, wobei auf eine Beugungsphase eine Streckung folgt (WOODBURY, 1980). Der tonische Krampfanfall endet oft mit dem Tod der Tiere.

Pentetrazol wird von allen Applikationsorten schnell resorbiert. Die Aufnahme von Pentetrazol ins Gehirn erfolgt ebenfalls schnell. Der Zeitpunkt des Auftretens der ersten Myoklonien und von klonischen Anfällen hängt vom Ort der Applikation ab, da dieser bestimmt, wie schnell kritische Gehirnkonzentrationen erreicht werden (YONEKAWA et al., 1980). STONE (1972) gibt die Latenz bei der Maus nach intraperitonealer Injektion von 50 bis 75 mg/kg Pentetrazol mit 1 - 3 Minuten an. YONEKAWA et al. (1980) stellten bei subkutaner Injektion von 90 mg/kg Pentetrazol eine Latenz von $5,1 \pm 3,0$ min. und bei intraperitonealer Injektion von 85 mg/kg Pentetrazol eine Latenz von $2,4 \pm 2,4$ min. bis zum Auftreten des klonischen Krampfanfalls fest.

Der genaue Wirkungsmechanismus von Pentetrazol ist nicht bekannt. Möglich ist, daß Pentetrazol am GABA-Rezeptor angreift,

möglich ist aber auch, daß es selektiv die durch GABA vermittelte postsynaptische Hemmung antagonisiert (WOODBURY, 1980).

Tabelle 1 gibt die antikonvulsiven ED_{50} von Ethosuximid, Valproat und Diazepam in Pentetrazol-Krampf-Tests mit Mäusen bei verschiedenen Autoren an.

Tabelle 1 Antikonvulsive ED_{50} von Ethosuximid, Valproat und Diazepam in Pentetrazol-Krampf-Tests.

Pentetrazol (mg/kg s.c.)	t	ED_{50} (mg/kg)			Autor
		Ethosuximid	Valproat	Diazepam	
85	30	130 (111-150) (i.p.)		0,165 (0,128-0,206) (i.p.)	Krall et al. (1978)
	15		149 (123-177) (i.p.)		Kupferberg (1980)
	60		388 (349-439) (p.o.)		
100	30		340 (290-400) (i.p.)		Löschner (1980)
	45	400 (320-500) (p.o.)	420 (290-610) (p.o.)		Frey und Löschner (1976)
	45	420 (350-500) (p.o.)	430 (310-600) (p.o.)		Löschner (1979)
	60			1,7 (1,3-2,3) (p.o.)	Löschner und Frey (1977)
	60	190 (160-230) (p.o.)			Frey (1964)
110	45	360 (270-470) (p.o.)			Meyer und Frey (1973)
125	60	500 (p.o.)		1,37 (p.o.)	Banzinger u. Hane (1967)

s.c. = bei subkutaner Eingabe

t = Zeit der Eingabe vor Pentetrazol in Minuten

i.p. = bei intraperitonealer Verabreichung

p.o. = bei oraler Eingabe

Angaben in Klammern geben den Vertrauensbereich für 95 % Wahrscheinlichkeit an.

2.3.2. Picrotoxin-Krampf

Picrotoxin wird von allen Applikationsorten schnell resorbiert, aber die krampfauslösende Wirkung tritt, selbst nach intravenöser Applikation, erst nach einigen Minuten auf. Es ist wahrscheinlich, daß die Umwandlung in einen aktiven Metaboliten oder die Wirkung auf ein wichtiges Enzymsystem im Gehirn für das verzögerte Auftreten der Krämpfe verantwortlich ist.

Die Krämpfe, die durch Picrotoxin ausgelöst werden, entsprechen in ihrem Erscheinungsbild dem Pentetrazol-Krampf.

Picrotoxin wirkt über eine Antagonisierung der von GABA vermittelten Hemmungen im ZNS (WOODBURY, 1980; STONE, 1972).

Tabelle 2 gibt die antikonvulsiven ED_{50} von Valproat, Ethosuximid und Diazepam im Picrotoxin-Krampf-Test bei verschiedenen Autoren an. Die Untersuchungen wurden an Mäusen durchgeführt.

Tabelle 2 Antikonvulsive ED₅₀ von Ethosuximid, Valproat und Diazepam in Picrotoxin-Krampf-Tests.

Picrotoxin (mg/kg s.c.)	t	ED ₅₀ (mg/kg)			Autor
		Ethosuximid	Valproat	Diazepam	
3,2	15		387 (341-444) (i.p.)		Kupferberg (1980)
	30	243 (228-255) (i.p.)			
4	45	330 (280-380) (p.o.)	200 (130-300) (p.o.)		Frey und Löscher (1976)
	60			1,6 (1,1-2,1) (p.o.)	Löscher u. Frey (1977)
	45	350 (250-480) (p.o.)	430 (290-640) (p.o.)		Löscher (1979)

t = Zeit der Eingabe vor Picrotoxin in Minuten

i.p. = bei intraperitonealer Verabreichung

p.o. = bei oraler Eingabe

Angaben in Klammern geben den Vertrauensbereich für 95 % Wahrscheinlichkeit an.

2.3.3. Bicucullin

Bicucullin ist wie Picrotoxin ein GABA-Antagonist. Die Krampferscheinungen, die durch Bicucullin ausgelöst werden, gleichen denen, die durch Picrotoxin verursacht werden, nur ist die Latenz bis zum Auftreten von Krämpfen bei Bicucullin, im Gegensatz zu Picrotoxin, sehr kurz (WOODBURY, 1980).

Tabelle 3 gibt die antikonvulsiven ED₅₀ von Valproat, Ethosuximid und Diazepam im Bicucullin-Krampf-Test bei verschiedenen Autoren an. Die Untersuchungen wurden an Mäusen durchgeführt.

Tabelle 3 Antikonvulsive ED₅₀ von Ethosuximid, Valproat und Diazepam in Bicucullin-Krampf-Tests.

Bicucullin (mg/kg s.c.)	t	ED ₅₀ (mg/kg)			Autor
		Ethosuximid	Valproat	Diazepam	
5,5	45	unwirksam bis 1 g/kg (p.o.)	600 (550-660) (p.o.)		Frey und Löscher (1976)
2,7	15		360 (294-439) (i.p.)		Kupferberg (1980)
	30	459 (350-635) (i.p.)			
5,5	60			3,1 (1,9-4,9) (p.o.)	Löscher und Frey (1977)

t = Zeit der Eingabe vor Bicucullin in Minuten

s.c. = bei subkutaner Eingabe

i.p. = bei intraperitonealer Verabreichung

p.o. = bei oraler Eingabe

Angaben in Klammern geben den Vertrauensbereich für 95 % Wahrscheinlichkeit an.

2.3.4. 3-Mercaptopropionsäure

3-Mercaptopropionsäure ist ein kompetitiver Hemmstoff der Glutamatdecarboxylase und verursacht Krämpfe durch eine Herabsetzung der GABA-Konzentration im Gehirn. Die Latenz bis zum Auftreten von Krämpfen ist kurz (WOODBURY, 1980).

Die durch 3-Mercaptopropionsäure ausgelösten Krämpfe beginnen plötzlich mit Laufanfällen, auf die klonisch-tonische Krämpfe mit Verlust der Stellreflexe folgen. Erste klonische Krampfanfälle treten nach subkutaner Injektion von 60 mg/kg (CD₉₇) zwischen 4 und 7 Minuten auf (LÖSCHER, 1979).

LÖSCHER (1979) gibt die antikonvulsive ED₅₀ von Natrium-valproat gegen die CD₉₇ von 3-Mercaptopropionsäure (60 mg/kg s.c.)

mit 370 (240-570) mg/kg an. Ethosuximid war bis zu einer Dosis von 1000 mg/kg unwirksam. Beide Stoffe wurden 45 Minuten vor 3-Mercaptopropionsäure oral eingegeben. Auch STONE und JAVID (1979) fanden Ethosuximid wirkungslos gegen 3-Mercaptopropionsäure.

2.3.5. Allylglycin

Allylglycin verursacht Krämpfe durch die Hemmung der Glutamatdecarboxylase und eine damit verbundene Senkung der GABA-Konzentration im Gehirn (ALBERICI et al., 1969; FISHER und DAVIES, 1976; WOODBURY, 1980).

Die Latenz bis zum Auftreten von Krämpfen ist lang, dies spricht entweder für ein langsames Durchdringen der Blut-Hirn-Schranke oder für eine Umwandlung in einen aktiven Metaboliten. Bei Mäusen konnte nach der Gabe von Allylglycin eine dosisabhängige Latenz von 45 bis 180 Minuten festgestellt werden (WOODBURY, 1980). HORTEN und MELDRUM (1973) stellten bei Mäusen nach der Gabe einer Dosis, die das ein- bis zweifache der CD_{50} betrug, eine Latenz von 160 Minuten fest.

Allylglycin verursacht klonische Zuckungen, generalisierte klonische Krampfanfälle und tonische Krämpfe mit anschließendem Tod (WOODBURY, 1980).

In Untersuchungen von ASHTON und WAUQUIER (1979) an Ratten war Valproat in Dosen von 160 bis 640 mg/kg p.o. wirksam gegen klonische und tonische Krämpfe und Tod innerhalb von 4 Stunden. Ethosuximid (320 mg/kg) war unwirksam. Die Antiepileptika wurden jeweils 2 Stunden vor Allylglycin (160 mg/kg) oral eingegeben.

2.3.6. Methionin-Sulfoximin

Methionin-Sulfoximin verursacht im Gehirn eine große Reihe biochemischer Veränderungen. Durch Angriffspunkte an verschiedenen Enzymen werden die Konzentrationen von Glutamat, Glutamin, GABA, Leuzin und anderen Stoffen herabgesetzt und die von Methionin, Cystein, Ammoniak und Glukose heraufgesetzt.

Methionin-Sulfoximin verursacht bei zahlreichen Tierarten nach längerer Latenz ein epileptiformes Syndrom, das in einigen Aspekten der Epilepsie beim Menschen gleicht.

Je nach Tierart beginnen die Anfälle 4 - 8 Stunden nach der Applikation und dauern 1 - 2 Tage. Ein breites Spektrum von Krampferscheinungen kann je nach Dosis beobachtet werden, von Myklonien bis hin zu generalisierten tonisch-klonischen Anfällen. Methionin kann die Krampferscheinungen antagonisieren (WOODBURY, 1980; STONE, 1972).

2.3.7. Fluoressigsäure

Fluoressigsäure ist ein metabolisches Gift, das den Citratzyklus teilweise blockiert. Der genaue Mechanismus der krampfauslösenden Wirkung ist nicht bekannt (WOODBURY, 1980).

Die Wirkungen und die erforderlichen Dosen unterscheiden sich stark bei verschiedenen Tierarten. Bei einigen Tierarten wird hauptsächlich das Herz betroffen, bei anderen das Gehirn. Ratten, Mäuse und Meerschweinchen reagieren teilweise mit Krampfanfällen (CHENOWETH, 1949; STONE, 1972).

Tiere zeigen eine Stunde nach der Eingabe von Fluoressigsäure oder später starke klonische und tonisch-klonische Krämpfe (WOODBURY, 1980).

CHENOWETH (1949) gibt die LD₅₀ bei Mäusen mit 5 bis 20 mg/kg an. Er weist auf die ungewöhnlich lange und unterschiedliche Latenz zwischen Eingabe und charakteristischer Wirkung hin.

2.3.8. 2,4-Dimethylsulfolan

Der Wirkungsmechanismus von 2,4-Dimethylsulfolan ist nicht bekannt. Der Stoff verursacht klonische und tonisch-klonische Krämpfe, die den durch Pentetrazol verursachten Krämpfen ähneln. Die CD₅₀ beträgt 69 mg/kg und die LD₅₀ 90 mg/kg. Krampferscheinungen lassen sich durch Valproat blockieren (WOODBURY, 1980).

2.3.9. Tetramethylenedisulfotetramin

Tetramethylenedisulfotetramin (TETS) ist ein hochtoxisches Kondensationsprodukt von einem Mol Sulfamid und zwei Mol Formaldehyd (HECHT und HENECKA, 1949). VOSS et al. (1961) geben die LD₅₀ bei Mäusen bei subkutaner Verabreichung mit 0,21 mg/kg an, HECHT und HENECKA (1949) geben eine LD₅₀ von 0,15 bis 0,20 mg/kg an.

Beobachtete Krampferscheinungen reichen von Zuckungen der Schnurrhaare über schwere klonische Krampfanfälle bis zu tonischen Streckkrämpfen mit anschließendem Tod (DRAY, 1975; HECHT und HENECKA, 1949).

HASKELL und VOSS (1957) stellten bei Hunden eine schnelle Resorption von TETS nach oraler Gabe fest.

Der genaue Wirkungsmechanismus von TETS ist nicht bekannt. Woodbury (1980) nimmt an, daß TETS über eine Blockade der GABA-Rezeptoren oder der GABA-aktivierten Veränderung der Chlorid-Conductance wirkt, DRAY (1975) erklärt die Wirkung von TETS mit einem möglichen Einfluß auf GABA- und Glycin-Rezeptoren.

VOSS et al. (1961) konnten Wirkungen von TETS mit Pheno-barbital, Barbital und Natriumbromid antagonisieren.

2.4. Weitere Modelle

2.4.1. Tottering-Mäuse

Tottering ist die Bezeichnung für eine rezessive Mutation bei Mäusen. Tiere, bei denen sie homozygot auftritt, haben einen wackligen Gang und von Zeit zu Zeit Krampfanfälle (GREEN und SIDMAN, 1962).

Spontane partielle motorische Anfälle können ab einem Alter von 3 - 4 Wochen beobachtet werden. Sie lassen sich nicht durch sensorische Reize auslösen, jedoch durch intraperitoneale Gabe von Pentetrazol in Dosen, die bei gesunden Wurfgeschwistern subkonvulsiv sind.

Heterozygote Wurfgeschwister unterscheiden sich im Verhalten und bei elektroenzephalographischen Untersuchungen nicht von normalen homozygoten Mäusen.

Bis jetzt konnten keine biochemischen oder morphologischen Ursachen für das Krampfverhalten entdeckt werden (NOEBELS und SIDMAN, 1979; NOEBELS, 1979).

Die Krampfanfälle können einmal bis mehrmals pro Tag beobachtet werden. Sie dauern 20 bis 30 Minuten. Während des Anfalls zeigen die Tiere klonische und tonisch-klonische Zuckungen einzelner oder mehrerer Extremitäten und Myoklonien am Kopf. Alle Extremitäten werden früher oder später betroffen, generalisierte Anfälle treten nicht auf (GREEN und SIDMAN, 1962; NOEBELS, 1979; NOEBELS und SIDMAN, 1979).

Neben den Krampfanfällen beschreibt NOEBELS (1979) das Auftreten

von Absenzen, die einige hundertmal pro Tag zu beobachten sind und im EEG von bilateral synchronen Spike-Wave Entladungen begleitet werden.

2.4.2. Gerbils

Der Mongolische Gerbil (*Meriones unguiculatus*) zeigt eine Reihe von natürlich auftretenden Erkrankungen, unter anderem eine Anfälligkeit für epileptische Anfälle (VINCENT et al., 1979).

Die epileptischen Anfälle können durch eine Reihe von Reizen ausgelöst werden. Sie treten auf nach Hantieren mit den Tieren, nach Anstrahlen mit Licht, nach hohen Tönen, nach Schütteln des Käfigs (KAPLAN, 1975) oder nach Umsetzen in eine fremde Umgebung (GOLDBLATT et al., 1971).

Die Anfälle werden von COX und LOMAX (1976) als spontan bezeichnet, GOLDBLATT et al. (1971) bezeichnen sie als xenogen, das heißt ausgelöst durch eine für die Tiere ungewohnte Umgebung. KAPLAN (1975) hält Streß für den auslösenden Faktor. Aufgrund von EEG-Untersuchungen ordnen LOSKOTA et al. (1974) die Anfälle den Reflexepilepsien zu. LOSKOTA und LOMAX (1975) konnten die Korrelation zwischen den klinisch beobachteten Phänomenen und der hirnelektrischen Aktivität darstellen. Sie fanden Hinweise, daß die Anfälle sowohl sensorisch ausgelöst werden können als auch spontan auftreten.

LOSKOTA et al. (1974) berichten über den selektiv gezüchteten krampfanfälligen Stamm WJL/UC, daß die ersten Anfälle im Alter von durchschnittlich 54 Tagen auftraten. Im Alter von 1 Monat hatten 5 % der Tiere Anfälle, im Alter von 2 Monaten 64 % und im Alter von 3 Monaten und danach hatten 97 % der Tiere Anfälle. Ebenfalls mit dem Alter einhergehend war die Krampfintensität, die sich im Alter von 2 bis 6 Monaten steigerte und ab 6 Monaten konstant blieb.

GOLDBLATT et al. (1971) berichten, daß, wenn Tiere wiederholt in 24-Stunden-Intervallen getestet werden, eine vorübergehende Gewöhnung auftritt, d.h. daß sich Krämpfe nicht mehr auslösen lassen. Wenn der Abstand zwischen den Tests größer ist, bleiben die Tiere für den Rest ihres Lebens krampfanfällig. Mindestens sechs Tage müssen zwischen Krampftests liegen, um verwertbare Ergebnisse zu erzielen (SCHONFELD und GLICK, 1980). LOSKOTA et al. (1972) ermittelten eine Refraktärphase von bis zu 5 Tagen. Nach sechs Tagen wurde die initiale Krampfintensität wieder erreicht.

KAPLAN und MIEZEJESKI (1972) stellten eine Unterdrückung der Krampfanfälligkeit fest, wenn Gerbils in wöchentlichen Abständen ab der ersten Lebenswoche einem krampfauslösenden Stimulus ausgesetzt werden. Sie schreiben diese Unterdrückung der Anfälle einer irreversiblen Veränderung der Empfindlichkeit durch Stimulierung in den ersten Lebenswochen zu.

Da die Tiere im Test mit einem stereotypen Krampfanfall reagierten, konnten LOSKOTA et al. (1974) die Krampferscheinungen in 7 Intensitätsstadien einordnen. Um die Krampfanfälle auszulösen, wurden die Tiere einzeln in einen leeren Käfig gesetzt. Die Einteilung in Krampfstadien ist in Tabelle 6 aufgeführt (S.44).

Untersuchungen von GOLDBLATT et al. (1971), LOSKOTA und LOMAX (1974) und COX und LOMAX (1976) zeigten eine Verringerung der Krampfaktivität durch die Antikonvulsiva Trimethadion, Phenobarbital und Pentobarbital. GOLDBLATT et al. (1971) fanden keinen Einfluß von Diphenylhydantoin auf die Krampfanfälle, LOSKOTA und LOMAX (1974) und COX und LOMAX (1976) konnten dagegen eine Unterdrückung der Krampfanfälle durch Diphenylhydantoin feststellen. Bei den Untersuchungen wurden die Tiere vor der Gabe der Antiepileptika mit Lachgas bzw. Ether narkotisiert, um einen Krampfanfall durch die Eingabe zu verhindern.

SCHONFELD und GLICK (1980) fanden für Ethosuximid und Diphenylhydantoin eine dosisabhängige Reduzierung der Krampfaktivität. Pentobarbital und Phenobarbital hatten in allen untersuchten Dosen einen antikonvulsiven Effekt. Die in dieser Studie ver-

wendeten Lösungsmittel hatten eine ausgeprägte antikonvulsive Wirkung, so daß die Ergebnisse schwer bewertbar sind.

Ethosuximid, Valproat und Diazepam werden beim Gerbil schnell metabolisiert und eliminiert, der Gerbil gleicht in dieser Hinsicht anderen kleinen Nagern (FREY et al., 1981).

2.4.3. Pentetrazol-Kindling bei der Ratte

Unter dem Begriff Kindling-Effekt versteht man die Entwicklung von epileptiformen Krämpfen durch die wiederholte, anfänglich nicht krampfauslösende, elektrische Stimulierung verschiedener Gehirnnareale (MASON und COOPER, 1972; ITO et al., 1977).

Das gleiche Phänomen konnte nach wiederholter Gabe anfänglich subkonvulsiver Dosen verschiedener Krampfgifte beobachtet werden (MASON und COOPER, 1972; PINEL und CHEUNG, 1977; ITO et al., 1977; NUTT et al., 1982; SYAPIN und RICKMAN, 1981; LAL et al., 1981; CZUCZWAR et al., 1982; ALBERTSON et al., 1981 a, 1981 b). Der Begriff "Kindling" wurde übernommen. Ob die Ursachen für diesen Effekt die gleichen sind wie bei elektrischem Kindling ist nicht bekannt (SYAPIN und RICKMAN, 1981).

Eine Reihe neuraler Reaktionen von örtlich begrenzten Nachentladungen, fokalen Krämpfen bis hin zu generalisierten Anfällen kann bei der Entwicklung des gekindelten Anfalls beobachtet werden. Das Modell bietet so die Möglichkeit, den Einfluß von Medikamenten auf die fortschreitenden Veränderungen zu untersuchen (ALBERTSON et al., 1981 b).

Aus klinischen Beobachtungen ist bekannt, daß viele Patienten mit Petit mal früher oder später andere Formen der Epilepsie entwickeln, insbesondere Grand mal. ITO et al. (1977) nehmen an, daß eine gewisse Ähnlichkeit zwischen der Entwicklung von Grand mal aus Petit mal beim Menschen und der Krampfentwicklung bei gekindelten Ratten besteht.

Zur Erzielung des Kindling-Effekts mit Pentetrazol werden verschiedene Dosen und Zeitabstände zwischen den Verabreichungen genannt. MASON und COOPER (1972) verabreichten bei Ratten 20 mg/kg Pentetrazol i.p. alle 2 - 3 Tage, erste Krampferscheinungen zeigten sich nach 13 - 15 Verabreichungen. Ein breites Spektrum an Krampferscheinungen von einzelnen Zuckungen bis hin zu Grand mal Anfällen konnte beobachtet werden.

NUTT et al. (1982) verabreichten Ratten jeden Tag 30 mg/kg Pentetrazol i.p., die ersten Anzeichen von Krampfaktivität traten nach 17 Tagen auf, bis zum 31. Behandlungstag zeigte keines der Tiere einen generalisierten tonisch-klonischen Anfall.

SYAPIN und RICKMAN (1981) stellten bei Mäusen nach täglicher Verabreichung von 20 mg/kg Pentetrazol i.p. einen geringen Grad von Kindling fest. Mäuse, die dreimal pro Woche mit 25 mg/kg Pentetrazol i.p. behandelt wurden, zeigten einen ausgeprägten Kindling-Effekt.

ITO et al. (1977) behandelten Ratten täglich mit 40 mg/kg Pentetrazol i.p. Die Tiere zeigten am ersten Behandlungstag klonische Krämpfe, die sich nach 3 - 6 Tagen zu stark ausgeprägten Krampfanfällen steigerten.

ALBERTSON et al. (1981 b) konnten bei Ratten die Entwicklung des Kindling-Effekts nach täglicher Gabe von 30 mg/kg Pentetrazol i.p. und 40 mg/kg Pentetrazol i.p. alle 2 Tage beobachten.

ITO et al. (1977) konnten eine Senkung der Krampfschwelle für intraperitoneal appliziertes Pentetrazol bei Ratten feststellen, die durch Kindling stark ausgeprägte Krampfanfälle entwickelt hatten.

NUTT et al. (1982) konnten keine Verringerung der Krampfschwelle bei der i.v. Applikation von Pentetrazol bei Ratten feststellen.

Die erhöhte Krampfanfälligkeit für Pentetrazol konnte von ITO et al. (1977) und MASON und COOPER (1972) noch nach monatelangen Ruhepausen festgestellt werden. MASON und COOPER (1972) schließen daher eine Kumulation von Pentetrazol als Erklärung für die beobachteten Phänomene aus.

ITO et al. (1977) ordneten die beobachteten Krampferscheinungen in 5 Stadien ein: 1= keine Krampferscheinungen, 2= Zucken des Kopfes, 3= klonischer Krampf, 4= Känguruh-Haltung - Stehen auf den Hinterbeinen (heftiger Krampfanfall), 5= klonisch-tonischer Krampf mit Verlust der Stellreflexe.

Untersuchungen von ALBERTSON et al. (1981 a, 1981 b) über den Einfluß von Phenobarbital und Diazepam auf die Modifizierung von Krampferscheinungen bei Pentetrazol-gekindelten Ratten ergaben eine dosisabhängige Reduzierung der Krampferscheinungen durch beide Stoffe.

ITO et al. (1977) konnten eine Reduzierung der Krampferscheinungen durch Trimethadion, Phenobarbital und Diphenylhydantoin bei gekindelten Ratten mit Krampfstadium 4 (heftiger Krampfanfall) feststellen.

2.4.4. Pentetrazol im Passive Avoidance Retention-Test

Dieses Modell wird von CLINCKE und WAUQUIER (1979) beschrieben.

Bei Absenzen, die bei Kindern im Alter von 3 bis 15 Jahren auftreten, werden die frequenten Bewußtseinsstörungen von einer retrograden Amnesie begleitet. CLINCKE und WAUQUIER vermuten, daß Pentetrazol in subkonvulsiven Dosen die Informationsverarbeitung auf ähnliche Weise behindert wie Petit mal-Absenzen.

In diesem Test wird ein zweigeteilter Kunststoffkäfig benutzt, ein Teil besteht aus einem elektrifizierbaren Gitter, der

andere Teil aus einer 6 cm hohen Plattform. Ratten werden auf die Plattform gesetzt und erhalten nach dem Herunterklettern auf das Gitter einen Stromstoß von 4 mA durch ihre Pfoten. Die Konditionierung wird so lange fortgesetzt, bis die Ratten ohne Unterbrechung für 3 Minuten auf der Plattform bleiben. 24 Stunden später erhalten die Ratten 30 Minuten vor dem Test 40 mg/kg Pentetrazol oder isotone Kochsalzlösung subkutan appliziert. Sie werden dann auf die Plattform gesetzt, und der Erhalt des Gelernten wird während 3 Minuten untersucht. Die Latenz bis zum Herunterklettern von der Plattform und die Gesamtzeit, die auf dem Gitter verbracht wird, sind ein Maß für die Merkfähigkeit, den Stromstoß zu vermeiden. Während des Tests steht das Gitter nicht unter Strom.

Im Versuch von CLINCKE und WAUQUIER zeigten die mit Pentetrazol behandelten Ratten eine starke Störung der Merkfähigkeit. Die durchschnittliche Latenz betrug $43,7 \pm 4$ Sekunden, wogegen die mit Kochsalzlösung behandelten Tiere einen guten Erhalt des Erlernten zeigten, die durchschnittliche Latenz betrug $150,9 \pm 12,7$ Sekunden.

CLINCKE und WAUQUIER untersuchten eine Reihe von Antiepileptika auf ihre Wirkung hinsichtlich des Erhalts der Merkfähigkeit. Ratten wurden konditioniert und 24 Stunden später, 5 Minuten vor der subkutanen Injektion von 40 mg/kg Pentetrazol mit verschiedenen Dosen der Stoffe intraperitoneal behandelt.

Ethosuximid, Trimethadion und Clonazepam erhöhten deutlich die Latenz bis zum Herunterklettern von der Plattform und verminderten die Zeit, die auf dem Gitter verbracht wurde. Natriumvalproat verringerte in der höchsten verwendeten Dosis die Zeit, die auf dem Gitter verbracht wurde.

KURTZ und PALFAI (1973) konnten bei Mäusen eine allgemeine Aktivitätsdepression nach der intraperitonealen Verabreichung von 50 mg/kg Pentetrazol feststellen. Die verwendete Dosis löste bei den Tieren klonische und gelegentlich tonische Krämpfe aus.

Im Passive Avoidance Retention-Test konnten sie keine signifikanten Unterschiede zwischen Gruppen, die vor dem Test mit Pentetrazol (50 mg/kg i.p.) behandelt wurden und Kontrollgruppen feststellen.

3. METHODEN

3.1. Tiermaterial

In Versuchen wurden folgende Tierarten und Stämme verwendet:

- männliche NMRI-Mäuse (NMRI (bom-wiga)), Gewicht 24 - 32 g, bezogen von der Wiga Versuchstierzuchtanstalt W. Gassner, Sulzfeld
- männliche Charles River CD1-Mäuse (Cr1: COBS CD-1(ICR)BR), Gewicht 24 - 32 g, bezogen von der Société des Elevages Charles River France, St-Aubin les-Elbeuf, Frankreich
- männliche und weibliche C57BL/6J-Mäuse (Jackson), Gewicht 18 - 32 g, sowie männliche und weibliche Tottering-Mäuse (C57BL/6J-tg (Jackson)), Gewicht 17 - 27 g, bezogen vom Institut für Versuchstierkunde der Freien Universität Berlin
- weibliche Wistar-Ratten (Bor:WISW (TNO)), Gewicht 130 - 240 g, bezogen von der Firma Winkelmann Versuchstierzucht, Borcken
- männliche und weibliche Mongolische Gerbils (Meriones unguiculatus), Gewicht 50 - 80 g, bezogen vom Bundesgesundheitsamt, Berlin

Mäuse, Ratten und Gerbils waren in Makrolon^R-Standardkäfigen (Typ 3) untergebracht. Die Anzahl der Tiere betrug jeweils 10 Mäuse, 3 Ratten bzw. 1 - 3 Gerbils pro Käfig. Die Einstreu bestand aus Holzspänen, Futter (Altromin Haltungsdiät Ratten und Mäuse, Altrogge GmbH, Lage) und Leitungswasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Die Umgebungstemperatur wurde bei konstant 25⁰ C gehalten, die relative Luftfeuchtigkeit betrug 50 - 60 %, die tägliche Beleuchtungsdauer 12 Stunden.

Tiere wurden frühestens 5 Tage nach ihrer Ankunft in Versuchen verwendet.

Versuche mit Mäusen, mit Ausnahme der Tottering-Mäuse, erfolgten vormittags, um eventuelle tageszeitliche Schwankungen gering zu halten.

Bei der Beobachtung der Krampferscheinungen wurden die Tiere, zur besseren Übersicht, in leere Käfige gesetzt.

In Versuchen mit Picrotoxin, Bicucullin, 3-Mercaptopropionsäure, Allylglycin, Fluoressigsäure, 2,4-Dimethylsulfolan und Tetramethyldisulfotetramin wurden Gruppen von je 10 NMRI-Mäusen pro Dosis verwendet.

3.2. Substanzen

Folgende Substanzen wurden verwendet:

- Ethosuximid (Petnidan^R-Saft), Desitin-Werk Carl Klincke, Hamburg;
- Valproinsäure, Natriumsalz (Orfiril^R-Saft),
Desitin-Werk Carl Klincke, Hamburg;
- Diazepam, Hoffmann-la Roche AG, Grenzach-Whylen;
- Pentetrazol, Knoll AG, Ludwigshafen;
- Picrotoxin, Fluka AG, Buchs, Schweiz;
- Bicucullin, Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA;
- 3-Mercaptopropionsäure, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn bei München;
- L-Methionin-Sulfoximin, Serva Feinbiochemica, Heidelberg;
- 2,4-Dimethylsulfolan, Fluka AG, Buchs, Schweiz;
- Fluoressigsäure, E. Merck, Darmstadt;
- Tetramethyldisulfotetramin, Bayer AG, Leverkusen;
- DL-C-Allylglycin, Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA;

Alle Stoffe wurden in Wasser gelöst bzw. mit Wasser verdünnt. Diazepam wurde mit Hilfe von 2 - 3 Tropfen 1 N Salzsäure in Lösung gebracht. Bicucullin wurde mit Hilfe von verdünnter Salzsäure in Lösung gebracht, die Lösung wurde auf pH 5,0 eingestellt. Ethosuximid, Valproat und Diazepam wurden stets oral

eingegeben. Dosisangaben für Valproat beziehen sich auf das Natriumsalz. Konvulsiva wurden parenteral verabreicht.

Bei Ratten betrugen die Flüssigkeitsvolumina der eingegebenen Lösungen von Diazepam, Ethosuximid und Pentetrazol und der isotonischen Kochsalzlösung jeweils 5 ml/kg, die von Valproat lagen zwischen 5 ml/kg und 15 ml/kg. Bei Mäusen wurden alle Konvulsiva, isotonische Kochsalzlösung und Diazepam in Flüssigkeitsvolumina von 10 ml/kg eingegeben. Ethosuximid wurde bei Dosen bis 500 mg/kg und Valproat bei Dosen bis 600 mg/kg in Flüssigkeitsvolumina von 10 ml/kg eingegeben. Bei Dosen von 500 bis 1000 mg/kg Ethosuximid bzw. 600 bis 1200 mg/kg Valproat betrugen die Flüssigkeitsvolumina 10 bis 20 ml/kg. Bei Gerbils betrugen die Flüssigkeitsvolumina der eingegebenen Lösungen von Diazepam und Valproat 5 ml/kg und die von Ethosuximid 5 bis 12 ml/kg.

3.3. Statistik

Die Bestimmung der CD_{97} und der antikonvulsiven ED_{50} erfolgte mit Hilfe der Methode von LITCHFIELD und WILCOXON (1949). Die Angaben in Klammern hinter der ED_{50} geben den Vertrauensbereich für 95 % Wahrscheinlichkeit an.

4. ERGEBNISSE

4.1. Krampfmodelle: Durch Konvulsiva ausgelöste generalisierte Krämpfe

4.1.1. Pentetrazol-Krampf

Die antikonvulsive Wirkung von Valproat, Ethosuximid und Diazepam wurde im Pentetrazol-Krampf-Test mit verschiedenen Mäusestämmen untersucht.

In Vorversuchen wurde die CD_{97} von Pentetrazol auf der Grundlage der auftretenden generalisierten klonischen Krampfanfälle mit Verlust der Stellreflexe bei NMRI und Charles River CD1-Mäusen ermittelt. Nach subkutaner Injektion und einem Beobachtungszeitraum von 30 Minuten betrug sie bei NMRI-Mäusen 80 mg/kg und bei Charles River CD1-Mäusen 90 mg/kg. Diese Dosen wurden im Hauptversuch eingesetzt. Bei Versuchen mit C 57 Bl/6J-Mäusen und bei intraperitonealer Gabe von Pentetrazol wurden jeweils 80 mg/kg Pentetrazol verabreicht.

Es ließen sich folgende Krampferscheinungen beobachten: einzelne Myoklonien, plötzliches, kurz andauerndes Zurückzucken des ganzen Körpers, nachfolgend als kleiner Krampf bezeichnet und generalisierte klonische Krämpfe, mit Verlust der Stellreflexe, nachfolgend als großer Krampf bezeichnet. Bei einigen wenigen Tieren schloß sich an den klonischen Krampfanfall eine tonische Streckphase an.

Valproat und Ethosuximid wurden bei NMRI-Mäusen 15, 30 und 45 Minuten vor subkutaner und 45 Minuten vor intraperitonealer Injektion von Pentetrazol eingegeben. Bei den Stämmen C57 Bl/6J wurden sie 30 Minuten und beim Stamm Charles River CD1 wurden sie 45 Minuten vor subkutaner Injektion von Pentetrazol eingegeben. Diazepam wurde 60 Minuten vor subkutaner Injektion von Pentetrazol bei den Stämmen NMRI und Charles River CD1 eingegeben.

Gruppen von 10 Tieren je Dosis wurden verwendet. Gruppen des Stammes C 57 Bl/6J setzten sich zusammen aus jeweils 3 männlichen und 7 weiblichen Tieren.

Nach der Eingabe der entsprechenden Dosen von Pentetrazol wurden die Mäuse 30 Minuten lang beobachtet.

Als Maß für die Wirkung der verwendeten Antikonvulsiva galt das Ausbleiben der kleinen und großen Krämpfe bzw. das Ausbleiben nur der großen Krämpfe.

Tabelle 4 gibt die ermittelten Werte der antikonvulsiven ED₅₀ an.

Tabelle 4 Antikonvulsive ED₅₀ von Ethosuximid, Valproat und Diazepam im Pentetrazol-Krampf-Test

Stamm	Pentetrazol Dosis (mg/kg)	Appl.	t	Unterdrückung	ED ₅₀ (mg/kg)		
					Valproat	Ethosuximid	Diazepam 1)
C57BL	80	s.c.	30	gr.Krampf	320 (248-413)	165 (149-183)	
Ch.R.	90	s.c.	45	gr.Krampf	390 (300-507)	225 (181-279)	0,48 (0,28-0,82)
CD 1				gr.u.kl. Krampf	600 (441-816)	280 (215-364)	0,87 (0,58-1,31)
NMRI	80	s.c.	15	gr.Krampf	420 (296-596)	145 (88-239)	
				gr.u.kl. Krampf	620 (400-961)	250 (158-395)	
	80	s.c.	30	gr.Krampf	450 (333-608)	170 (126-230)	
				gr.u.kl. Krampf		205 (150-281)	
	80	s.c.	45	gr.Krampf	520 (390-690)	255 (190-340)	0,63 (0,47-0,83)
				gr.u.kl. Krampf	580 (420-790)	300 (240-380)	0,73 (0,53-0,99)
	80	i.p.	45	gr.Krampf	745 (611-909)	305 (270-345)	
				gr.u.kl. Krampf	1030 (730-1452)	305 (270-345)	

- t = Zeitpunkt der Applikation von Pentetrazol nach Vorbehandlung mit Valproat und Ethosuximid in Minuten
- 1) = Vorbehandlung mit Diazepam 1 Stunde vor Pentetrazol
- s.c. = subkutane Applikation von Pentetrazol
- i.p. = intraperitoneale Applikation von Pentetrazol

4.1.2. Picrotoxin-Krampf

Versuche wurden mit jeweils 10 NMRI-Mäusen pro Dosis durchgeführt.

Nach der subkutanen Verabreichung von Picrotoxin konnten neben den schon bei Pentetrazol beobachteten kleinen und großen Krämpfen Krampferscheinungen festgestellt werden, die in ihrer Intensität zwischen kleinem und großem Krampf lagen. Die Tiere liefen mit erhöhtem Muskeltonus und gespreizten Hinterbeinen herum, sie richteten sich auf den Hinterbeinen auf und führten mit den Vorderextremitäten klonische Boxbewegungen aus.

Auf der Grundlage der großen Krämpfe mit Verlust der Stellreflexe wurde die CD_{97} ermittelt, sie betrug bei subkutaner Applikation 4 mg/kg. Nach der Injektion von Picrotoxin wurden die Tiere jeweils 30 Minuten beobachtet. Bei einer Dosis von 4 mg/kg s.c. starben 2 von 10 Tieren innerhalb einer halben Stunde. Die Latenz bis zum Auftreten der großen Krämpfe betrug bei dieser Dosis durchschnittlich ca. 14 Minuten.

30 Minuten nach Vorbehandlung mit Ethosuximid oder Valproat wurde die CD_{97} von Picrotoxin verabreicht. Als Maß für die Wirkung von Ethosuximid und Valproat galt das Ausbleiben des großen Krampfes mit Verlust der Stellreflexe.

Die antikonvulsive ED_{50} für Valproat betrug 710 (542-930) mg/kg und für Ethosuximid 390 (265-573) mg/kg (Tabelle 5).

Tabelle 5 Antikonvulsive ED₅₀ bei verschiedenen Krampfmodellen

Krampfmodell	t	Unter- drückung	ED ₅₀ (mg/kg)		
			Valproat	Etho- suximid	Diazepam
Picrotoxin 3) 4 mg/kg s.c.	30	gr. Krampf	710 (542-930)	390 (265-573)	
Bicucullin 3) 3,4 mg/kg s.c.	30	gr. Krampf	560 (389-806)	740 (583-940)	
Mercapto- 3) propionsäure 75 mg/kg s.c.	30	gr. Krampf und Lauf- anfall	880 (727- 1065)	unwirksam bis 1000	
3) Allylglycin 250 mg/kg i.p.	2) 30	gr. Krampf	350 (273-448)	>1000	
		gr.+ kl.Krampf	410 (308-545)	>1000	
		Tod in 4 h	270 (225-324)	>1000	
		Tod in 48 h	340 (260-445)	>1000	
2,4-Dimethyl- sulfolan 3) 110 mg/kg s.c.	30	gr. Krampf Tod in 1/2 h	980 (852-1127) 420 (309-571)	710 (538-937) ≈ 150	
Tetramethylendi- sulfotetramin 3) 0,65 mg/kg s.c.	30	gr. Krampf	600 (408-882)	255 (161-403)	0,7 1) (0,42-1,16)
Kindling 4)	30	Stadien 1 u. 2	>900	158 (134-186)	2,8 1) (1,2-6,4)
Gerbil	45	Stadien 1 u. 2	210 (142-311)	360 (240-540)	0,38 (0,24-0,60)
Tottering-Mäuse	0	sämtliche Krämpfe	unwirksam bis 600	unwirksam bis 500	1,15 (0,58-2,30)

t = Zeitpunkt der Applikation von Ethosuximid und Valproat
vor dem Test in Minuten

1) = Applikation von Diazepam 1 Stunde vor Test

2) = Applikation von Ethosuximid und Valproat 30 Minuten
nach Allylglycin

3) = verwendete Versuchstiere NMRI-Mäuse

4) = verwendete Versuchstiere Wistar-Ratten

4.1.3. Bicucullin

Versuche wurden mit jeweils 10 NMRI-Mäusen pro Dosis durchgeführt.

Die Tiere zeigten nach der Eingabe von Bicucullin die gleichen Krampferscheinungen wie die mit Picrotoxin behandelten Tiere, jedoch war die Latenz wesentlich kürzer. Bei 4 mg/kg s.c. traten erste Krämpfe bereits nach 3 Minuten auf, die durchschnittliche Latenz betrug ca. 5 Minuten für den großen Krampf. Bei 3 mg/kg s.c. starben innerhalb von 30 Minuten 5 von 10 Tieren, bei 4 mg/kg s.c. starben alle Tiere.

Die CD_{97} wurde auf der Grundlage der großen Krämpfe mit Verlust der Stellreflexe ermittelt, sie betrug 3,4 mg/kg bei subkutaner Applikation. Nach der Eingabe von Bicucullin wurden die Tiere jeweils 30 Minuten beobachtet.

30 Minuten nach Vorbehandlung mit Ethosuximid oder Valproat wurde die CD_{97} von Bicucullin verabreicht. Als Maß für die Wirkung von Ethosuximid und Valproat galt das Ausbleiben des großen Krampfes mit Verlust der Stellreflexe.

Die ED_{50} für Valproat betrug 560 (389-806) mg/kg, für Ethosuximid 740 (583-940) mg/kg (Tabelle 5).

4.1.4. 3-Mercaptopropionsäure

Versuche wurden mit jeweils 10 NMRI-Mäusen pro Dosis durchgeführt.

Mit 3-Mercaptopropionsäure behandelte Tiere zeigten ein breites Spektrum von Krampferscheinungen. Neben klonischen Zuckungen einzelner Extremitäten und kontrollierten Hüpfbewegungen traten wilde, unkontrollierte Laufanfälle auf, auf die ein klonisch-

tonischer Anfall (großer Anfall) mit Verlust der Stellreflexe folgte. Bei 65 mg/kg 3-Mercaptopropionsäure betrug die durchschnittliche Latenz bis zum Auftreten von großen Krämpfen ca. 6 Minuten.

Die CD₉₇ wurde auf der Grundlage der auftretenden Laufanfälle mit anschließendem großen Anfall und Verlust der Stellreflexe ermittelt, sie betrug 75 mg/kg bei subkutaner Applikation. Nach der Eingabe von 3-Mercaptopropionsäure wurden die Tiere jeweils 30 Minuten beobachtet.

Ethosuximid oder Valproat wurden jeweils 30 Minuten vor der CD₉₇ von 3-Mercaptopropionsäure eingegeben. Als Maß für die antikonvulsive Wirkung von Valproat und Ethosuximid galt das Ausbleiben der Laufanfälle und des anschließenden großen Krampfs mit Verlust der Stellreflexe.

Die ED₅₀ von Valproat betrug 880 (727-1065) mg/kg. Ethosuximid war bis zu einer Dosis von 1000 mg/kg unwirksam (Tabelle 5).

4.1.5. Allylglycin

Versuche wurden mit jeweils 10 NMRI-Mäusen pro Dosis durchgeführt.

Nach der intraperitonealen Gabe von 250 mg/kg Allylglycin hatten 90 % der Tiere generalisierte klonische Krampfanfälle mit Verlust der Stellreflexe (große Krämpfe) innerhalb von 90 Minuten. Die Latenzen bis zum Auftreten dieser Krampfanfälle lagen zwischen 61 und 118 Minuten. Neben generalisierten klonischen Krämpfen konnten einzelne Myoklonien, Zurückzucken des ganzen Körpers (kleiner Krampf), Laufbewegungen mit erhöhtem Tonus und tonische Hüpfbewegungen beobachtet werden. Alle Tiere starben in einem tonischen Streckkrampf nach Latenzen zwischen 87 und 135 Minuten.

Ethosuximid und Valproat wurden 30 Minuten nach der intra-peritonealen Injektion von 250 mg/kg Allylglycin eingegeben.

Als Maß für die Wirkung von Ethosuximid und Valproat galt das Ausbleiben von großen Krämpfen, bzw. kleinen und großen Krämpfen innerhalb einer Stunde und außerdem der Schutz vor Tod innerhalb von 4 Stunden und innerhalb von 48 Stunden.

Eine Dosis von 1000 mg/kg Ethosuximid verhinderte bei 50 % der Tiere einen großen Krampf innerhalb einer Stunde, 30 % waren für eine Stunde gegen kleinen und großen Krampf geschützt. Gegen Tod innerhalb 4 und 48 Stunden waren 60 % der Tiere geschützt.

Die ED_{50} von Valproat bei Schutz vor dem großen Krampf innerhalb einer Stunde betrug 350 (273-448) mg/kg, bei Schutz vor kleinem und großem Krampf innerhalb einer Stunde 410 (308-545) mg/kg, bei Schutz vor Tod innerhalb von 4 Stunden 270 (225-324) mg/kg und bei Schutz vor Tod innerhalb von 48 Stunden 340 (260-445) mg/kg (Tabelle 5).

Ethosuximid und Valproat verlängerten auch die Latenz bis zum Auftreten von Krämpfen und bis zum Tod. Diese Verlängerung war dosisabhängig und fiel bei gleichen Dosen bei Valproat stärker aus als bei Ethosuximid.

4.1.6. Methionin-Sulfoximin

Pro Dosis wurden 7 - 10 NMRI-Mäuse verwendet. Nach der intra-peritonealen Injektion von Methionin-Sulfoximin wurden die Tiere 8,5 Stunden beobachtet.

Krampfanfälle kündigten sich durch ataktische Bewegungen an, die 1 - 2 Stunden vor großen Krämpfen auftraten. Die beobachteten Krampferscheinungen umfaßten myoklonische Zuckungen einzelner Extremitäten, generalisierte klonische Krampfanfälle

mit Verlust der Stellreflexe und tonische Streckkrämpfe, die die Tiere in der Regel überlebten.

Auf der Grundlage der klonischen Krampfanfälle und der tonischen Streckkrämpfe wurde die CD_{97} ermittelt, sie betrug 205 mg/kg Methionin-Sulfoximin i.p., bei einem Beobachtungszeitraum von 8,5 Stunden.

Bei 150 mg/kg i.p. betrug die Latenz bis zum Auftreten von klonischen Krampfanfällen durchschnittlich 5 Stunden 55 Minuten. Die kürzeste beobachtete Latenz betrug dabei 4 Stunden 47 Minuten, die längste 8 Stunden 20 Minuten.

Versuche mit Antiepileptika wurden wegen der langen Latenz bis zum Auftreten von Krampferscheinungen und der großen Streuung der Latenzzeiten nicht durchgeführt.

4.1.7. Fluoressigsäure

Versuche wurden mit jeweils 10 NMRI-Mäusen pro Dosis durchgeführt.

Mit Fluoressigsäure behandelte Tiere zeigten Ataxie, Myoklonien, generalisierte klonische Krampfanfälle und/oder tonische Streckkrämpfe, die mit dem Tod der Tiere endeten.

Bei einer Beobachtungsdauer von 6 Stunden hatten bei 20 mg/kg s.c. 40 % der Tiere generalisierte klonische Krampfanfälle, bei Latenzen zwischen 66 und 310 Minuten. Bei 80 mg/kg s.c. hatten alle Tiere generalisierte klonische Krämpfe oder tonische Streckkrämpfe. 80 % der Tiere starben innerhalb von 6 Stunden. Die Latenzen bis zum Auftreten der Krämpfe lagen zwischen 28 und 111 Minuten.

Bei 30 mg/kg Fluoressigsäure i.p. hatten alle Tiere klonische Krämpfe oder tonische Streckkrämpfe bei Latenzen zwischen 30 und 201 Minuten, 20 % der Tiere starben innerhalb von 6 Stunden.

Bei 80 mg/kg i.p. lagen die Latenzen bis zum Auftreten der Krämpfe zwischen 33 und 111 Minuten. Alle Tiere starben innerhalb von 6 Stunden.

Versuche mit Antiepileptika wurden wegen der langen Latenz bis zum Auftreten von Krampferscheinungen und der großen Streuung der Latenzzeiten nicht durchgeführt.

4.1.8. 2,4-Dimethylsulfolan

Versuche wurden mit jeweils 10 NMRI-Mäusen pro Dosis durchgeführt.

Nach der Verabreichung von 2,4-Dimethylsulfolan konnten einzelne Myoklonien, Zurückzucken des ganzen Körpers, generalisierte klonische Krämpfe mit Verlust der Stellreflexe (große Krämpfe) und tonische Streckkrämpfe, die mit dem Tod der Tiere endeten, beobachtet werden. Die CD_{97} wurde auf der Grundlage der auftretenden großen Krämpfe ermittelt, sie betrug 110 mg/kg bei subkutaner Applikation. Nach der Gabe von 2,4-Dimethylsulfolan wurden die Tiere jeweils 30 Minuten beobachtet.

Ethosuximid und Valproat wurden 30 Minuten vor der CD_{97} von 2,4-Dimethylsulfolan eingegeben. Beide Stoffe schützten sowohl vor großen Krämpfen als auch vor Tod innerhalb von 30 Minuten.

Die ED_{50} von Valproat betrug für Schutz vor großen Krämpfen 980 (852-1127) mg/kg und für Schutz vor Tod innerhalb von 30 Minuten 420 (309-571) mg/kg.

Zur Ermittlung der ED_{50} von Ethosuximid für den Schutz vor großen Krämpfen wurden erst Dosen ab 500 mg/kg berücksichtigt, da bei Dosen zwischen 250 mg/kg und 500 mg/kg jeweils 20 % der Tiere geschützt waren. Die auf dieser Grundlage ermittelte ED_{50} betrug 710 (538-937) mg/kg.

150 mg/kg Ethosuximid schützten 50 % der Tiere vor Tod innerhalb einer halben Stunde. Niedrigere Dosen wurden nicht untersucht (Tabelle 5).

4.1.9. Tetramethylenedisulfotetramin (TETS)

Versuche wurden mit jeweils 10 NMRI-Mäusen pro Dosis durchgeführt.

Nach der Applikation von TETS traten die gleichen Krampferscheinungen auf wie bei Pentetrazol: Myoklonien, kurzes Zurückzucken des ganzen Körpers (kleiner Krampf), klonische Krämpfe mit Verlust der Stellreflexe (großer Krampf) und tonische Streckkrämpfe. Bei 1 mg/kg starben alle Tiere in einem tonischen Streckkrampf innerhalb von 30 Minuten.

Der klonische Krampfanfall mit Verlust der Stellreflexe (großer Krampf) war die Grundlage für die Ermittlung der CD_{97} , sie betrug 0,65 mg/kg TETS bei subkutaner Applikation. Nach der Eingabe von TETS wurden die Tiere jeweils 30 Minuten beobachtet.

Die Verhinderung des großen Krampfes war das Maß für die Wirkung von Ethosuximid, Valproat und Diazepam. Ethosuximid und Valproat wurden 30 Minuten und Diazepam 1 Stunde vor der subkutanen Applikation von 0,65 mg/kg TETS eingegeben.

Die ED_{50} von Ethosuximid betrug 255 (161-403) mg/kg, die von Valproat 600 (408-882) mg/kg und die von Diazepam 0,70 (0,42-1,16) mg/kg (Tabelle 5).

4.2. Weitere Modelle

4.2.1. Tottering-Mäuse

Die Zucht von Tottering-Mäusen erwies sich als sehr aufwendig. Zur Zucht wurden heterozygote Tiere verwendet, da sich homozygote Tottering-Mäuse als wenig vermehrungsfreudig erwiesen. Unter den Nachkommen der gepaarten heterozygoten Tiere befanden sich daher lediglich ca. 25 % homozygote Tottering-Mäuse.

Vor Versuchen mit Antiepileptika wurden Tottering-Mäuse über Stunden zu verschiedenen Tageszeiten beobachtet. Krampfanfälle traten unregelmäßig und nach keinem erkennbaren Muster auf. 93 % aller beobachteten Krampfanfälle dauerten 15 Minuten oder länger.

Krampfanfälle begannen mit einer tonischen seitlichen Streckung der Hinterextremitäten, wobei die Tiere sich auf dem Bauch kriechend vorwärts bewegten. Anschließend folgten tonisch-klonische Zuckungen einzelner oder beider Hinterextremitäten, die sich bald auch auf die Vorderextremitäten ausbreiteten, bis schließlich nur die Vorderextremitäten tonisch-klonische Zuckungen zeigten. Zeitweilig war der Kopf dabei maximal nach vorne auf die Brust geneigt. Die Tiere lagen während der Anfälle flach auf dem Bauch, in Seitenlage oder auf dem Rücken. Die Anfälle endeten mit klonischen Zuckungen einzelner oder beider Vorderextremitäten.

Die antikonvulsive Wirkung von Ethosuximid und Valproat wurde an jeweils 5 Tieren, die von Diazepam an 10 Tieren pro Dosis untersucht. Tiere wurden mehrmals im Versuch verwendet, jedoch höchstens 3 mal und in Intervallen von wenigstens 4 Wochen.

Antiepileptika wurden sofort nach Auftreten der ersten Krampferscheinungen oral eingegeben. Als Kriterium für antikonvulsive Wirkung galt das Verschwinden der Krampferscheinungen 15 Minuten nach Eingabe der Antiepileptika und Krampffreiheit während der 30 folgenden Minuten.

Ethosuximid war bis 500 mg/kg unwirksam, 3 Tiere zeigten bei dieser Dosis leichte Ataxie und zeitweiligen Verlust der Stellreflexe. Bei 1000 mg/kg hatten alle Tiere eine schwere Ataxie und zeitweiligen Verlust der Stellreflexe, eine Beurteilung der Krampferscheinungen war nicht mehr möglich.

Valproat war bis 600 mg/kg unwirksam. Alle Tiere zeigten bei dieser Dosis eine leichte Ataxie und zeitweiligen Verlust der Stellreflexe. Bei 1200 mg/kg waren die Ausfallserscheinungen so ausgeprägt, daß eine Krampfunterdrückung nicht mehr beurteilt werden konnte.

Für Diazepam konnte eine Dosis-Wirkungs-Kurve aufgestellt werden, die ED₅₀ für die Unterdrückung der Krämpfe innerhalb von 15 Minuten und Krampffreiheit während der folgenden 30 Minuten betrug 1,15 (0,58-2,30) mg/kg (Tabelle 5).

4.2.2. Gerbils

Gerbils wurden einmal pro Woche getestet. Sie wurden dazu aus ihrem vertrauten Käfig genommen, in einen leeren Makrolon^R-Käfig Typ 2 gesetzt und 10 Sekunden lang mit Druckluft (ca. 5 bar) angeblasen. Danach wurden sie 5 Minuten lang beobachtet.

Die auftretenden Krampferscheinungen wurden in Anlehnung an LOSKOTA et al. (1974) einer Einteilung in Intensitätsstadien zugeordnet. Die Einteilung ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6 Krampfstadien beim Gerbil, modifiziert
nach LOSKOTA et al. (1974)

- Stadium 0 kein Krampf bei freier Beweglichkeit im Test-
käfig nach 10 sec anblasen mit Preßluft
- Stadium 1 Tier in Bewegung; kurzes Zucken der Augenlider,
Ohren und Schnurrhaare
- Stadium 2 normale Bewegung ist plötzlich unterbrochen,
begleitet von Zucken der Augenlider, Ohren und
Schnurrhaare
- Stadium 3 Tier steht still, myoklonische Krämpfe, Kopf und
Körper an den Boden gedrückt, Rücken gebeugt,
nach längerer Starre "quick release"
- Stadium 4 klonisch-tonische Krämpfe, Opisthotonus,
tonischer Status mit Extension der Extremitäten,
aufgerichteter Schwanz, kein "quick release"
- Stadium 5 klonisch-tonische Krämpfe, zusätzlich Verlust
der Stellreflexe, Körperrolle seitlich oder
rückwärts, Opisthotonus
- Stadium 6 Fortschreiten der Krämpfe bis zum Tod

Die Einteilung in Intensitätsstadien war möglich, da die Tiere ein bestimmtes Muster an motorischer Aktivität zeigten, das sich im Laufe der Zeit in der Intensität steigerte, sehr stereotyp und von Woche zu Woche gut reproduzierbar war und weil bei intensiven Anfällen oft sämtliche Stadien durchlaufen wurden.

Für Versuche mit Antiepileptika wurden Tiere verwendet, die vorher an 3 aufeinander folgenden Wochen Krampfstadium 1 oder 2 gezeigt hatten. Ihr Mindestalter betrug 10 Wochen. Valproat, Ethosuximid und Diazepam wurden 45 Minuten vor dem Test eingegeben. Gerbils, die während der Eingabe oder direkt anschließend Krampferscheinungen zeigten, wurden aus dem Versuch ausgeschlossen.

Nach der Eingabe wurden die Tiere wieder in ihren eigenen Käfig gesetzt. Pro Dosis wurden 8 - 10 Tiere verwendet. Wenn Tiere mehrmals verwendet wurden, geschah dies erst, nachdem sie wiederum in 3 aufeinander folgenden Wochen Krampfstadium 1 oder 2 gezeigt hatten.

Krampfstadien 1 und 2 wurden verwendet, da angenommen wurde, daß diese Stadien den Erscheinungen bei Petit mal beim Menschen ähnlicher sind als Stadien 3, 4 und 5.

Als Maß für die antikonvulsive Wirkung der verwendeten Antiepileptika galt das Ausbleiben aller Krampferscheinungen.

Die ED₅₀ von Valproat betrug 210 (142-311) mg/kg, die von Ethosuximid 360 (240-540) mg/kg und die von Diazepam 0,38 (0,24-0,60) mg/kg (Tabelle 5).

4.2.3. Pentetrazol-Kindling

Für die Versuche wurden weibliche Wistar-Ratten verwendet. Bei Versuchsbeginn hatten die Tiere ein Gewicht von 130 - 150 g, bei Versuchsende ein Gewicht von 180 - 210 g. Nach der Applikation von Pentetrazol wurden die Tiere jeweils 30 Minuten beobachtet.

4.2.3.1. Beobachtungen der Krampferscheinungen und deren Entwicklung

In Vorversuchen wurde der Verlauf der Krampfintensität nach intraperitonealer Injektion einer Lösung von 30 mg/kg Pentetrazol an 20 Tieren untersucht. Pentetrazol wurde 3 mal pro Woche (Montags, Mittwochs, Freitags) appliziert. Nach durchschnittlich 3 - 4 Behandlungen zeigten die Tiere erste Krampferscheinungen. Am 6. Behandlungstag hatten 95 % der Tiere Krämpfe verschiedener Intensitätsstadien, die in Anlehnung an ITO et al. (1977) wie folgt eingeteilt und definiert wurden:

- Stadium 1 Zuckungen der Augenlider, der Ohren oder des ganzen Kopfes
- Stadium 2 Leichtes Zurückzucken des ganzen Körpers
- Stadium 3 Intensives Zurückzucken des ganzen Körpers, Spreizen der Hinterextremitäten, tonisches Heranziehen der Vorderextremitäten an die Brust, erhöhter Tonus
- Stadium 4 Klonisch-tonischer Krampf ohne Verlust der Stellreflexe, Aufrichten auf den Hinterbeinen, mit Schwanz als Stütze, Boxbewegungen (Känguruh-Stellung)
- Stadium 5 Klonisch-tonischer Krampf mit Verlust der Stellreflexe, wildes Umherspringen

Stadium 5 wurde nach Durchlaufen geringerer Intensitätsstadien an vorhergehenden Behandlungstagen erreicht. Einmal erreichte Stadien wurden beibehalten oder verstärkt. Die Krampfentwicklung verlief mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Einige Tiere zeigten bis zum sechsten Behandlungstag Stadium 2, andere zeigten innerhalb von vier Behandlungstagen eine rasche Entwicklung bis zum Stadium 5 (Tabelle 7a).

Tabelle 7 a Verlauf der Krampfintensität nach Injektion von 30 mg/kg Pentetrazol i.p. 3 mal pro Woche, Krampfstadien nach ITO et al. (1977)

Tier Nr.	1.	2.	3.	4.	5.	6. Behandlungstag
1	-	-	-	3	4	3
2	-	-	-	1	2	2
3	-	-	-	2	2	2
4	-	-	1	-	1	-
5	-	-	-	2	2	2
6	-	-	-	2	2	2
7	-	-	3	2	2	3
8	-	-	3	5	2	4
9	-	-	-	2	2	4
10	-	2	2	5	4	5
11	-	-	-	2	2	2
12	-	-	-	2	1	1
13	1	2	2	4	4	3
14	-	-	2	2	2	2
15	-	-	2	2	2	2
16	-	1	-	3	4	5
17	-	-	-	2	2	4
18	1	2	3	3	4	4
19	-	-	-	-	2	3
20	-	-	-	2	2	2

4.2.3.2. Einfluß von Ethosuximid und Valproat auf die Krampfentwicklung

Es wurde untersucht, inwieweit Ethosuximid und Valproat das Auftreten des Kindling-Effekts beeinflussen können. Je 10 Tiere wurden 3 mal pro Woche 30 Minuten vor der intraperitonealen Injektion von 30 mg/kg Pentetrazol mit 200 mg/kg Valproat bzw. 200 mg/kg Ethosuximid vorbehandelt. Die mit Ethosuximid vorbehandelte Gruppe zeigte bis zum 6. Behandlungstag keine Krampferscheinungen (Tabelle 7b). Am 7. Behandlungstag wurden die Tiere ohne Vorbehandlung mit 30 mg/kg Pentetrazol i.p. getestet. Dabei zeigten 80 % der Tiere Krampferscheinungen.

80 % der mit Valproat vorbehandelten Tiere hatten am 6. Behandlungstag Krämpfe (Tabelle 7b).

Tabelle 7b Unterdrückung des Kindling-Effekts
Krampferscheinungen am 6. Behandlungstag

		% der Tiere mit Krampferscheinungen
vorbehandelt jeweils 1/2 h vor 30 mg/kg Pentetrazol i.p.	Ethosuximid 200 mg/kg	0 %
	Valproat 200 mg/kg	80 %
Unvorbehandelt		95 %

4.2.3.3. Wirkung von Antiepileptika auf die Krampferscheinungen

30 mg/kg Pentetrazol wurden wie im Vorversuch 3 mal pro Woche intraperitoneal injiziert. Für den Versuch mit Antiepileptika wurden Tiere verwendet, die an drei aufeinander folgenden Behandlungstagen Stadium 2 oder an vier aufeinander folgenden Behandlungstagen 2 mal Stadium 1 und dann 2 mal Stadium 2 zeigten. Tiere, die Stadium 3 oder ein höheres Stadium zeigten, wurden nicht im Versuch verwendet. Am Versuchstag wurden Ethosuximid und Valproat 30 Minuten und Diazepam 1 Stunde vor Gabe von Pentetrazol oral eingegeben. Als Kriterium für die Wirksamkeit der Antiepileptika galt die Unterdrückung jeglicher Krampferscheinungen innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 30 Minuten nach der Injektion von Pentetrazol. Pro Dosis wurden 7 - 10 Tiere verwendet.

Die ED_{50} von Ethosuximid betrug 158 (134-186) mg/kg, die von Diazepam betrug 2,8 (1,2-6,4) mg/kg. Eine ED_{50} von Valproat konnte nicht ermittelt werden, da mit 900 mg/kg lediglich 50 % der Tiere geschützt waren (Tabelle 5).

4.2.3.4. Kindling-Versuche mit Mäusen

Weitere Kindling-Versuche wurden mit NMRI-Mäusen durchgeführt. Jeweils 10 Tiere wurden mit 30 bzw. 40 mg/kg Pentetrazol i.p. 3 mal pro Woche behandelt. Tabelle 7c gibt den Anteil der Tiere mit Krampferscheinungen am jeweiligen Behandlungstag an. Krampferscheinungen umfaßten Myoklonien, kurzes Zurückzucken des ganzen Körpers (kleiner Krampf) und generalisierte klonische Krämpfe mit Verlust der Stellreflexe (großer Krampf). Die Beobachtungsdauer betrug jeweils 30 Minuten.

Tabelle 7c Kindling Mäuse

Anteil der Tiere mit Krampferscheinungen

Behandlungstag	Pentetrazol	
	30 mg/kg i.p.	40 mg/kg i.p.
1	0 %	0 %
2	0 %	10 %
3	0 %	40 %
4	0 %	50 %
5	0 %	60 %
6	0 %	60 %
7	0 %	60 %
8	0 %	70 %
9	0 %	80 %
10	10 %	80 %
11	30 %	80 %
12	60 %	80 %
13	60 %	90 %

4.2.4. Passive Avoidance Retention-Test

Wie im Versuch von CLINCKE und WAUQUIER (1979) wurde ein zweigeteilter Kunststoffkäfig verwendet. In der einen Hälfte des Käfigs befand sich ein elektrifizierbares Gitter, in der anderen eine Plattform, die wahlweise auf 3 oder 6 cm Höhe eingestellt werden konnte. Die Vorderseite des Käfigs bestand aus durchsichtigem Kunststoffmaterial. Ein Metall-

deckel deckte den Käfig nach oben ab. Ein elektrisches Reizgerät erzeugte Stromstöße für das elektrifizierbare Gitter. Die Pulsdauer der Stromstöße betrug bei allen Versuchen 0,1 ms, die Frequenz 5 s^{-1} . Das Gitter stand nur während der Konditionierung unter Strom. Bei der Untersuchung des Erhalts der Merkfähigkeit 24 Stunden nach der Konditionierung wurden keine Stromstöße ausgeteilt. Bei Versuchen mit Ratten war die Plattform in 6 cm Höhe angebracht, bei Versuchen mit Mäusen in 3 cm Höhe. Alle Tiere wurden nur einmal verwendet.

Die Flüssigkeitsvolumina der applizierten Lösungen betrugen bei Ratten jeweils 5 ml/kg und bei Mäusen jeweils 10 ml/kg.

Ratten mit einem Gewicht von 220 bis 240 g wurden einzeln auf die Plattform (6 cm Höhe) gesetzt und erhielten nach dem Herunterklettern auf das elektrifizierbare Gitter Stromstöße von 4 mA durch ihre Pfoten. Diese Konditionierung wurde so lange fortgesetzt, bis die Tiere während 3 Minuten die Plattform nicht verließen.

24 Stunden später erhielt eine Kontrollgruppe von 11 Tieren 0,9 % Kochsalzlösung subkutan appliziert, 7 Tiere wurden mit 40 mg/kg Pentetrazol subkutan behandelt, jeweils 6 Tiere erhielten 30 mg/kg bzw. 35 mg/kg Pentetrazol. 30 Minuten später wurden die Tiere auf die Plattform gesetzt und 3 Minuten beobachtet. Die Latenz bis zum Herunterklettern von der Plattform und die Zeit, die auf dem Gitter verbracht wurde, wurden notiert. Beide sind ein Maß für den Erhalt der Merkfähigkeit, den Stromstoß zu vermeiden.

Von den mit Pentetrazol behandelten Tieren verließ keines die Plattform innerhalb von 3 Minuten, von der Kontrollgruppe verließen 3 Tiere die Plattform.

Weitere Versuche mit Ratten wurden mit Tieren mit Gewichten zwischen 130 und 150 g durchgeführt. Bei gleichem Versuchsaufbau wurden jeweils 4 Ratten mit 40 mg/kg oder 30 mg/kg Pentetrazol subkutan behandelt.

Kein Tier verließ die Plattform innerhalb von 3 Minuten.

Um das Interesse der Ratten an ihrer Umgebung zu steigern, wurde ihnen 6 Stunden vor dem Test das Futter entzogen. Zwei Gruppen zu je 4 Tieren wurden mit 40 mg/kg Pentetrazol subkutan behandelt, eine Kontrollgruppe von 4 Tieren erhielt Kochsalzlösung subkutan jeweils 30 Minuten vor dem Test. Bei einer mit Pentetrazol behandelten Gruppe befand sich während des Tests ein Futterschälchen auf den Gitter.

Während 2 Tiere der Kontrollgruppe die Plattform verließen, verließ nur jeweils 1 Tier der mit Pentetrazol behandelten Gruppen die Plattform innerhalb von 3 Minuten.

Nach 20-stündigem Futterentzug wurden 2 Gruppen mit je 4 Tieren mit 40 mg/kg Pentetrazol behandelt, eine Kontrollgruppe von 4 Tieren erhielt Kochsalzlösung subkutan. Bei einer mit Pentetrazol behandelten Gruppe befand sich ein Futterschälchen auf dem Gitter. Keines der mit Pentetrazol behandelten Tiere verließ die Plattform innerhalb von 3 Minuten, ein Tier aus der Kontrollgruppe verließ die Plattform.

In zwei weiteren Versuchen wurden je 4 Tiere mit Stromstößen von 1 mA bzw. 2 mA konditioniert. Die Tiere erhielten 30 Minuten vor dem Test jeweils 40 mg/kg Pentetrazol subkutan. Im Test verließ kein Tier die Plattform innerhalb von 3 Minuten.

Weitere Versuche wurden mit NMRI-Mäusen und Charles River-Mäusen durchgeführt. Die bei der Konditionierung verwendete Stromstärke wurde variiert, ebenso die verabreichten Dosen Pentetrazol und die Zeit der Eingabe vor dem Test. Tabelle 8 gibt die jeweiligen Versuchsbedingungen und die Zahl der Tiere an, die innerhalb von 3 Minuten die Plattform (3 cm Höhe) verließen.

Die mit Pentetrazol behandelten Tiere verließen die Plattform in den meisten Fällen gar nicht oder nur vereinzelt. In Versuchen, bei denen mindestens 40 % der Tiere die Plattform verließen (Konditionierung mit 1 mA, 20 bzw. 30 mg/kg Pentetrazol subkutan 20 Minuten vor dem Test und Konditionierung mit 0,5 mA, 20 mg/kg Pentetrazol subkutan 20 Minuten vor Test), wurde die durchschnittliche Latenz bis zum Herunterklettern ermittelt und mit denen von Kontrollgruppen verglichen.

In keinem Fall konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Versuche mit Antiepileptika wurden daher nicht durchgeführt.

Tabelle 8 Passive Avoidance Retention-Test bei Mäusen

Stromstärke (mA)	Pentetrazol (mg/kg) s.c. bzw. NaCl-Lösung s.c.	t	N	H
4	40	30	5	0
4	NaCl	30	4	0
4	20	20	6	2
4	30	20	6	0
4	25	20	6	1
4	20	30	6	1
4	40	20	5	0
2	NaCl	20	3	2
2	40	20	3	0
1	40	20	3	0
1	30	20	10	6
1	NaCl	20	10	5
1	20	20	10	6
0,5	NaCl	20	10	4
0,5	20	20	10	4

Stromstärke = Stromstärke, mit der die Tiere 24 Stunden vor dem Test konditioniert wurden

t = Zeit der Eingabe von Pentetrazol s.c. bzw. von Kochsalzlösung s.c. vor dem Test in Minuten

N = Anzahl der Tiere pro Gruppe

H = Anzahl der Tiere pro Gruppe, die die Plattform innerhalb von 3 Minuten verließen

5. DISKUSSION

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Krampfmodelle auf ihre Eignung als Screening-Modelle für die Auffindung von bei Petit mal-Epilepsien wirksamen Substanzen zu untersuchen. Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe der klinisch bewährten Petit mal-Antiepileptika Ethosuximid und Valproat, in einigen Fällen zusätzlich mit Diazepam. Ein brauchbares Modell müßte die antikonvulsive Wirkung dieser Stoffe erfassen, das heißt, Krampferscheinungen müssen sich durch sie unterdrücken bzw. verhindern lassen.

Ein Maß für die Empfindlichkeit eines Modells ist die antikonvulsive ED_{50} der verwendeten Antikonvulsiva gegen die Krampferscheinungen. Je niedriger die ED_{50} , desto empfindlicher ist das Modell und desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß auch schwächer antikonvulsiv wirkende Stoffe damit erkannt werden.

Um als Screening-Modell brauchbar zu sein, sollte ein Krampf-test schnell und ohne großen Aufwand durchzuführen sein.

Im subkutanen Pentetrazol-Krampf-Test, dem Standardtest zur Auffindung von bei Petit mal-Epilepsien wirksamen Substanzen, waren, wie zu erwarten, Valproat, Ethosuximid und Diazepam wirksam gegen die ausgelösten Krampferscheinungen. Der Mäusestamm Charles River-CD1 scheint etwas empfindlicher gegenüber der antikonvulsiven Wirkung der Antiepileptika zu sein als der Stamm NMRI. Die ED_{50} von Valproat, Ethosuximid und Diazepam waren bei gleicher Vorbehandlungszeit und einer höheren Dosis Pentetrazol bei Charles River-CD1-Mäusen niedriger. Bei C 57 Bl/-6J-Mäusen waren die ED_{50} von Valproat und Ethosuximid bei vergleichbaren Vorbehandlungszeiten etwas niedriger als bei NMRI-Mäusen. Es könnte also von Vorteil sein, die etwas empfindlicheren Mäusestämme in Screening-Versuchen einzusetzen.

Bei NMRI-Mäusen waren die ED_{50} von Valproat und Ethosuximid, bei einer Vorbehandlungszeit von 15 Minuten, etwas niedriger als bei Vorbehandlungszeiten von 30 und 45 Minuten. Dies spricht dafür, daß Valproat und Ethosuximid ihre maximale Wirkung gegen den durch Pentetrazol ausgelösten generalisierten klonischen Krampfanfall bereits nach 15 Minuten erreichen.

Bei der intraperitonealen Applikation von Pentetrazol waren die ED_{50} von Valproat und Ethosuximid höher als bei der subkutanen Applikation der gleichen Dosis. Dieser Unterschied läßt sich durch die größere Wirksamkeit von Pentetrazol bei intraperitonealer Applikation erklären. Ein Nachteil bei der intraperitonealen Applikation von Pentetrazol sind die, verglichen mit subkutaner Applikation, teilweise sehr kurzen Latenzzeiten bis zum Auftreten der Krämpfe, wodurch die Behandlung von 10 Tieren vor Krampfeintritt erschwert wird.

Die Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit ermittelten ED_{50} der Antiepileptika und den in der Literatur angegebenen dürften in den meisten Fällen auf Unterschiede bei der Dosierung von Pentetrazol, dem Weg der Applikation der Antiepileptika und den Vorbehandlungszeiten zurückzuführen sein. Möglicherweise spielen auch Unterschiede in der Empfindlichkeit der verwendeten Mäusestämme gegenüber Pentetrazol bzw. gegenüber den verwendeten Antiepileptika eine Rolle. Die ED_{50} von Valproat und Ethosuximid bei intraperitonealer Applikation (KRALL et al., 1978; KUPFERBERG, 1980; LÜSCHER, 1980) liegen deutlich unter den in dieser Untersuchung ermittelten ED_{50} bei oraler Eingabe und gleichen Vorbehandlungszeiten. Ursache hierfür dürfte die unvollständige Resorption von Valproat und Ethosuximid nach oraler Eingabe innerhalb des Vorbehandlungszeitraumes sein (EL-SAYED et al., 1978; LÜSCHER und ESENWEIN, 1978).

Im Picrotoxin-Krampf-Test waren bei gleicher Vorbehandlungszeit wesentlich höhere Dosen Valproat und Ethosuximid zur Unterdrückung der Krampferscheinungen erforderlich als im Pentetrazol-Krampf-Test. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von FREY und LÜSCHER (1976) und LÜSCHER (1979),

dort waren, bei gleicher Dosierung von Picrotoxin (4 mg/kg s.c.), Valproat und Ethosuximid wirksamer als im Pentetrazol-Krampf-Test bzw. genauso wirksam. Als mögliche Erklärung bietet sich eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Versuchstiere gegenüber den verwendeten Substanzen an. Unter Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse scheint das Picrotoxin-Modell, auf Grund seiner geringeren Empfindlichkeit, als Screening-Modell für die Auffindung von bei Petit mal-Epilepsien wirksamen Substanzen weniger geeignet zu sein als das Pentetrazol-Modell.

Die ED₅₀ von Ethosuximid im Bicucullin-Krampf-Test war deutlich höher als vergleichbare ED₅₀ im Pentetrazol-Krampf-Test. Das Bicucullin-Modell ist also, wie das Picrotoxin-Modell, wegen seiner geringeren Empfindlichkeit weniger geeignet als das Pentetrazol-Modell. FREY und LÖSCHER (1976) fanden Ethosuximid bis 1 g/kg unwirksam gegen Bicucullin. Dieses Ergebnis läßt sich durch die von ihnen verwendete höhere Dosis Bicucullin von 5,5 mg/kg s.c. erklären. Die von KUPFERBERG (1980) ermittelten niedrigeren ED₅₀ von Ethosuximid und Valproat lassen sich wiederum durch die intraperitoneale Applikation der Antiepileptika und durch die niedrigere Dosis Bicucullin von 2,7 mg/kg s.c. erklären.

Gegen die durch 3-Mercaptopropionsäure ausgelösten Krampferscheinungen war Ethosuximid bis zu einer Dosis von 1000 mg/kg unwirksam. Dieses Ergebnis entspricht den Untersuchungen von LÖSCHER (1979) und STONE und JAVID (1979). Die ED₅₀ von Valproat war fast doppelt so hoch wie die vergleichbare ED₅₀ im Pentetrazol-Krampf-Test. Die niedrigere ED₅₀ von Valproat in der Untersuchung von LÖSCHER (1979) läßt sich wahrscheinlich durch die dort eingesetzte niedrigere Dosis von 3-Mercaptopropionsäure erklären. Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß sich die durch 3-Mercaptopropionsäure ausgelösten Krampferscheinungen nicht als Modell zur Auffindung von bei Petit mal-Epilepsien wirksamen Substanzen eignen.

Ethosuximid war gegen die durch Allylglycin ausgelösten Krampferscheinungen und Todesfälle in Dosen bis 1000 mg/kg nur wenig wirksam. Die ED_{50} von Valproat gegen die Wirkungen von Allylglycin liegt im Bereich der im Pentetrazol-Krampf-Test ermittelten Werte. Die Ergebnisse entsprechen denen von ASHTON und WAUQUIER (1979). Die durch Allylglycin verursachten Erscheinungen eignen sich also auch nicht als Modell zur Auffindung von bei Petit mal wirksamen Substanzen, da die Anti-Petit mal-Wirkung von Ethosuximid in diesem Modell nicht deutlich wird. Gegen den Einsatz von Allylglycin in Screening-Versuchen spricht außerdem die lange Latenz bis zum Auftreten von Krampferscheinungen und die große Streuung der Latenzzeiten.

Wegen der langen Latenz bis zum Auftreten von Krampferscheinungen und der großen Streuung der Latenzzeiten nach der Eingabe von Methionin-Sulfoximin und Fluoressigsäure, erschien eine Untersuchung der Wirkung von Ethosuximid und Valproat auf die Krampferscheinungen nicht sinnvoll. Auf Grund der kurzen Halbwertszeiten der beiden Stoffe bei Mäusen, wäre eine mehrmalige Eingabe oder eine Dauerbehandlung nötig gewesen, um eventuell wirksame Spiegel aufrecht zu halten. Damit wäre eine Vergleichbarkeit mit anderen Modellen nicht mehr gegeben. Auch eine Untersuchung von Stoffen mit unterschiedlichen Halbwertszeiten dürfte nicht ohne größeren Aufwand zu bewerkstelligen sein. Für den Einsatz in Screening-Modellen sind Methionin-Sulfoximin und Fluoressigsäure daher nicht geeignet.

Gegen die durch 2,4-Dimethylsulfolan ausgelösten Krampferscheinungen waren Ethosuximid und Valproat weit weniger wirksam als im Pentetrazol-Krampf-Test bei gleicher Vorbehandlungszeit. In dieser Hinsicht ist das Modell also nicht sehr empfindlich. Die ED_{50} für Schutz vor Tod innerhalb einer halben Stunde sind vergleichbar mit den Werten, die im Pentetrazol-Krampf-Test gegen den großen Krampf bei einer Vorbehandlungszeit von 30 Minuten ermittelt wurden. Dennoch scheint dieses Modell weniger geeignet zu sein als das Pentetrazol-

Modell, da bei der Verhinderung des Todes durch Valproat und Ethosuximid eventuell unspezifische Wirkungen zum Tragen kommen.

Die im Tetramethyldisulfotetramin (TETS)-Krampf-Test ermittelten ED_{50} von Ethosuximid, Valproat und Diazepam lagen nur geringfügig über den ED_{50} gegen den großen Krampf im Pentetrazol-Krampf-Test, bei gleichen Vorbehandlungszeiten. Das Krampfmodell ist also ähnlich empfindlich wie das Pentetrazol-Modell und könnte daher als Screening-Modell geeignet sein. Von Nachteil ist die hohe Toxizität von TETS, da mit diesem Stoff nur unter großen Vorsichtsmaßnahmen gearbeitet werden kann.

Ein Vorteil, den Tottering-Mäuse gegenüber herkömmlichen Screening-Methoden haben, ist, wie NOEBELS (1979) angibt, die Tatsache, daß die Krampfanfälle bei diesen Tieren spontan auftreten, was ermöglicht, die antikonvulsiven Eigenschaften eines Stoffes gegenüber einem normalen funktionellen Hintergrund zu untersuchen. Von Nachteil ist, daß die Krampferscheinungen bei Tottering-Mäusen relativ selten und unregelmäßig auftreten, was eine Beobachtung der Tiere über lange Zeiträume erforderlich macht. Um die Wirkung von Ethosuximid, Valproat und Diazepam auf die Krampferscheinungen im akuten Test untersuchen zu können, wurden die Stoffen in unserer Untersuchung sofort nach dem Auftreten erster Krampferscheinungen oral eingegeben. Ethosuximid war bis zu einer Dosis von 500 mg/kg unwirksam, Valproat bis zu einer Dosis von 600 mg/kg. Da die bei höheren Dosen ausgeprägten Ausfallerscheinungen eine Beurteilung der Krampferscheinungen nicht mehr zuließen, besteht die Möglichkeit, daß eine antikonvulsive Wirkung von Ethosuximid und Valproat verdeckt wurde. Die ED_{50} von Diazepam gegen die Krampferscheinungen war etwa doppelt so hoch wie im Pentetrazol-Krampf-Test zur Unterdrückung der großen Krämpfe. Das Modell der Tottering-Mäuse scheint zur Auffindung von bei Petit mal wirksamen Substanzen zu unempfindlich zu sein. Wegen der relativ selten auftretenden Krämpfe, dürfte es sich nicht als Screening-Modell eignen, da Versuche mit einem zu hohen Zeitaufwand verbunden wären.

Der Gerbil stellt ein interessantes Modell zur Erforschung der Epilepsien dar, da sich Krampferscheinungen ohne chirurgische, chemische oder elektrische Eingriffe leicht und gut reproduzierbar auslösen lassen. In unseren Untersuchungen lagen die ED_{50} von Valproat und Diazepam gegen die Krampfstadien 1 und 2 beim Gerbil unter den in Pentetrazol-Krampf-Tests ermittelten Werten. Die ED_{50} von Ethosuximid gegen Krampfstadien 1 und 2 lag etwas höher. Krampfstadien 1 und 2 beim Gerbil bieten sich somit als Modell zur Auffindung von bei Petit mal-Epilepsien wirksamen Substanzen an. In weiterführenden Untersuchungen an unserem Institut (FREY et al., in Vorbereitung) konnte festgestellt werden, daß sich Krampfstadium 3, 4 und 5 durch Grand mal-Antiepileptika unterdrücken lassen; diese Stoffe waren gegen Krampfstadien 1 und 2 weniger wirksam, Petit mal-Antiepileptika waren gegen Krampfstadien 1 und 2 besser wirksam als gegen Krampfstadien 3, 4 und 5. Die Krampferscheinungen beim Gerbil eignen sich damit möglicherweise zur Darstellung der selektiven Wirkung von Antikonvulsiva auf verschiedene Krampftypen. Versuche mit Gerbils sind mit einem relativ hohen Zeitaufwand verbunden, da Tests nur in wöchentlichen Abständen durchgeführt werden können (LOSKOTA et al., 1972; SCHONFELD und GLICK, 1980). Um Krampferscheinungen nicht schon während der Eingabe von zu untersuchenden Stoffen auszulösen, ist ein sehr vorsichtiger Umgang mit den Tieren geboten. Aus den genannten Gründen sind Gerbils weniger gut für Screening-Untersuchungen geeignet.

Im akuten Test von Ethosuximid, Valproat und Diazepam gegen die durch Pentetrazol-Kindling ausgelösten Krampfstadien 1 und 2 erwies sich Ethosuximid als sehr wirksam. Die ED_{50} lag im Bereich der beiden niedrigsten ED_{50} von Ethosuximid in Pentetrazol-Krampf-Tests. Diazepam war weit weniger wirksam als im Pentetrazol-Krampf-Test und Valproat zeigte nur eine sehr geringe Wirkung. Da die antikonvulsive Wirkung von Valproat nicht deutlich wird, scheint das Modell zur Auffindung von bei Petit mal-Epilepsien wirksamen Substanzen nicht geeignet. Da Krampferscheinungen erst nach mehreren Behandlungstagen auftreten und somit der Zeitaufwand ziemlich groß ist, dürfte sich das Modell nicht für Screening-Versuche eignen.

In Versuchen mit Pentetrazol im Passive Avoidance Retention-Test konnte die von CLINCKE und WAUQUIER (1979) beschriebene Störung der Merkfähigkeit durch Pentetrazol nicht beobachtet werden. Mit Kochsalzlösung vorbehandelte Ratten verließen die Plattform in größerer Zahl als mit Pentetrazol behandelte Tiere. Bei Versuchen mit Mäusen verließen zwar mehr Tiere die Plattform als in Versuchen mit Ratten, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied in der Latenz zwischen Kontrollgruppen und mit Pentetrazol behandelten Gruppen festgestellt werden. Aus diesem Grund erübrigte sich eine Untersuchung des Einflusses von Antiepileptika auf den Erhalt der Merkfähigkeit. Eine Erklärung für die von CLINCKE und WAUQUIERs (1979) Ergebnissen abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung könnte in der von KURTZ und PALFAI (1973) beschriebenen, durch Pentetrazol verursachten, allgemeinen Aktivitätsdepression zu suchen sein, die eine Störung der Merkfähigkeit möglicherweise überdeckt.

Von den in dieser Arbeit untersuchten Krampfmodellen waren neben dem subkutanen Pentetrazol-Krampf-Modell lediglich das Tetramethyldisulfotetramin-Modell und das Gerbil-Modell genügend empfindlich gegenüber der antikonvulsiven Wirkung von Ethosuximid, Valproat und Diazepam, um als Modell für die Auffindung von bei Petit mal-Epilepsien wirksamen Substanzen gelten zu können. Als Screening-Modell dürfte neben dem Pentetrazol-Modell nur das Tetramethyldisulfotetramin-Modell geeignet sein. Die anderen in dieser Arbeit untersuchten Modelle eignen sich möglicherweise zur Erforschung verschiedener Aspekte der Epilepsien.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Eine Reihe von Krampfmodellen sollte mit Hilfe der klinisch bewährten Petit mal-Antiepileptika Ethosuximid und Valproat, in einigen Fällen zusätzlich mit Diazepam, auf ihre Eignung als Screening-Modelle für die Auffindung von bei Petit mal-Epilepsien wirksamen Substanzen untersucht werden. Ein geeignetes Modell müßte sich durch ausreichende Empfindlichkeit, die sich in einer niedrigen ED₅₀ der verwendeten Antikonvulsiva gegen die Krampferscheinungen ausdrückt und durch rasche und einfache Durchführbarkeit auszeichnen.

Krampferscheinungen wurden bei Mäusen durch folgende Konvulsiva ausgelöst:

Pentetrazol

Picrotoxin

Bicucullin

3-Mercaptopropionsäure

Allylglycin

Methionin-Sulfoximin

Fluoressigsäure

2,4-Dimethylsulfolan und

Tetramethyldisulfotetramin (TETS)

Zusätzlich sollten folgende Modelle untersucht werden:

Krampferscheinungen bei Tottering-Mäusen und Gerbils, Pentetrazol-Kindling bei der Ratte und die durch Pentetrazol verursachte Störung der Merkfähigkeit im Passive Avoidance Retention-Test bei Ratten und Mäusen.

Methionin-Sulfoximin und Fluoressigsäure schienen wegen der langen Latenz bis zum Auftreten von Krampferscheinungen und der großen Streuung der Latenzzeiten nach Verabreichung nicht zur weiteren Untersuchung mit Antiepileptika geeignet. Eine Störung der Merkfähigkeit durch Pentetrazol im Passive Avoidance Retention-Test konnte nicht festgestellt werden, deshalb entfiel auch hier die Untersuchung mit Antiepileptika.

Von den mit Antiepileptika untersuchten Modellen erwiesen sich neben dem subkutanen Pentetrazol-Krampf-Modell lediglich das

TETS-Modell und das Gerbil-Modell als genügend empfindlich. Da jedoch Versuche mit Gerbils relativ aufwendig sind, dürfte als Screening-Modell neben dem Pentetrazol-Modell lediglich das TETS-Modell geeignet sein.

7. SUMMARY

A number of seizure models were to be examined with regard to their potential usefulness as screening models for the detection of petit mal-effective drugs. They were to be examined with the aid of ethosuximide and valproate and in some cases also with diazepam, drugs which are clinically effective in the treatment of petit mal seizures. A useful model should be sufficiently sensitive in detecting anti-petit mal activity. This would be indicated by a low ED₅₀ of the used anticonvulsants against the seizures. Experiments should also be easy to carry out and should require only little time.

Seizures were induced in mice by the following convulsants:

Pentylenetetrazol
Picrotoxin
Bicuculline
3-Mercaptopropionic acid
Allylglycine
Methionine sulfoximine
Fluoroacetic acid
2,4-Dimethylsulfolane and
Tetramethylenedisulphotetramine (TETS)

The following models were also to be examined: seizures in tottering mice and gerbils, pentylenetetrazol-kindled seizures in rats and pentylenetetrazol-produced impairment of passive avoidance retention in rats and mice.

Methionine sulfoximine and fluoroacetic acid were not suited for testing with anticonvulsants because of the long time to seizure onset after administration and the wide range in times before the seizures appeared. Since an impairment of passive avoidance retention by pentylenetetrazol could not be reproduced, this model was not tested with anticonvulsants either.

Of the models tested with anticonvulsants only the subcutaneous pentylenetetrazol, TETS and gerbil models were sufficiently sensitive, but, since experiments with gerbils are rather time-consuming, only the TETS model seems to be a useful screening model besides the pentylenetetrazol model.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- ALBERICI, M., RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ, G. and DE ROBERTIS, E.:
Glutamic acid decarboxylase inhibition and ultra-
structural changes by the convulsant drug allylglycine
Biochem. Pharmacol. 18: 137-143 (1969)
- ALBERTSON, T.E., PETERSON, S.L., STARK, L.G., LAKIN, M.L.
and WINTERS, W.D.:
The anticonvulsant properties of melatonin on
kindled seizures in rats
Neuropharmacology 20: 61-66 (1981 a)
- ALBERTSON, T.E., PETERSON, S.L. and STARK, L.G.:
The anticonvulsant effects of diazepam and pheno-
barbital in prekindled and kindled seizures in rats
Neuropharmacology 20: 597-603 (1981 b)
- ASHTON, D. and WAUQUIER, A.:
Effects of some anti-epileptic, neuroleptic and
gabaminergic drugs on convulsions induced by
D,L-allylglycine
Pharmacol. Biochem. Behav. 11: 221-226 (1979)
- BANZIGER, R. and HANE, D.:
Evaluation of a new convulsant for anticonvulsant
screening
Arch. int. Pharmacodyn. 167: 245-249 (1967)
- CHENOWETH, M.B.:
Monofluoroacetic acid and related compounds
Pharmacol. Rev. 1: 383-424 (1949)
- CLINCKE, G. and WAUQUIER, A.:
Metrazol-produced impairment of passive avoidance re-
tention specifically antagonized by anti-petit mal
drugs
Psychopharmacology 66: 243-246 (1979)

COUTINHO, C.B., CHERIPKO, J.A. and CARBONE, J.J.:

Correlation between the duration of the anticonvulsant activity of diazepam and its physiological disposition in mice
Biochem. Pharmacol. 19: 363-379 (1970)

COX, B. and LOMAX, P.:

Brain amines and spontaneous epileptic seizures in the Mongolian gerbil
Pharmacol. Biochem. Behav. 4: 263-267 (1976)

CZUCZWAR, S.J., TURSKI, L., TURSKI, W. and KLEINROK, Z.:

Convulsant action of pentetrazol in rats with selective lesions of the hippocampal pyramidal cells with intracerebroventricular kainic acid
Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol. 4: 293-298 (1982)

DRAY, A.:

Tetramethylenedisulphotetramine and amino acid inhibition in the rat brain
Neuropharmacology 14: 703-705 (1975)

EADIE, M.J. and TYRER, J.H.:

Anticonvulsant therapy. Pharmacological basis and practice 2nd Ed.
Churchill Livingstone, London-Edinburgh 1980

EL-SAYED, M.A., LÖSCHER, W. and FREY, H.-H.:

Pharmacokinetics of ethosuximide in the dog
Arch. int. Pharmacodyn. 234: 180-192 (1978)

FERRENDELLI, J.A. and KUPFERBERG, H.J.:

Antiepileptic drugs. Succinimides
In: Antiepileptic drugs: mechanisms of action ed. by G.H. Glaser, J.K. Penry and D.M. Woodbury
Raven Press, New York 1980, pp 587-596

FISHER, S.K. and DAVIES, W.E.:

The effect of the convulsant allylglycine
(2-amino-4-pentenoic acid) on the activity of
glutamic acid decarboxylase and the concentration
of GABA in different regions of guinea pig brain
Biochem. Pharmacol. 25: 1881-1885 (1976)

FREY, H.-H.:

Note on the interactions of amphetamine
with anticonvulsant drugs
Acta pharmacol. (Kbh.) 21: 290-298 (1964)

FREY, H.-H. and LÜSCHER, W.:

Di-n-propylacetic acid-profile of anticonvulsant
activity in mice
Arzneimittel-Forsch. 26: 299-301 (1976)

FREY, H.-H.:

Entwicklung von Antiepileptica
In: Tierversuche. Eine Methode bei der Entwicklung
zentralnervös wirkender Arzneimittel
K.H. Sontag (Hrsg.), Editio Cantor Aulendorf 1981,
S. 59-70

FREY, H.-H., LÜSCHER, W., REICHE, R. and SCHULTZ, D.:

Pharmacology of antiepileptic drugs in the gerbil
I. Pharmacokinetics
Neuropharmacology 20: 769-771 (1981)

FREY, H.-H., LÜSCHER, W., REICHE, R. and SCHULTZ, D.:

Anticonvulsant potency of common antiepileptic drugs
in the gerbil
(in Vorbereitung)

FROMM, G.H. and KOHLI, Ch.M.:

The role of inhibitory pathways in petit mal epilepsy
Neurology 22: 1012-1020 (1972)

FROMM, G.H., GLASS, J.D., CHATTA, A.S., MARTINEZ, A.J. and SILVERMAN, M.:

Antiaabsence drugs and inhibitory pathways
Neurology 30: 126-131 (1980)

GASTAUT, H.:

Clinical and electroencephalographical classification
of epileptic seizures
Epilepsia 10: Suppl. 2 (1969)

GASTAUT, H.:

Dictionary of epilepsy
Part I: Definitions
World Health Organisation, Geneva 1973

GOLDBLATT, D., KONOW, A., SHOULSON, I. and MAC MATH, T.:

Effect of anticonvulsants on seizures in gerbils
Neurology 21: 433-434 (1971)

GREEN, M.C. and SIDMAN, R.L.:

Tottering - a neuromuscular mutation in the mouse
and its linkage with oligosyndactylism
J. Hered. 53: 233-237 (1962)

HASKELL, A.R. and VOSS, E.:

The pharmacology of tetramine (tetraethylene-
disulfotetramine)
J. Amer. pharm. Ass., sci. Ed. 46: 239-242 (1957)

HECHT, G. und HENECKA, H.:

Über ein hochtoxisches Kondensationsprodukt von
Sulfamid und Formaldehyd
Angew. Chem. 61: 365-366 (1949)

HORTON, R.W. and MELDRUM, B.S.:

Seizures induced by allylglycine, 3-mercaptopropionic acid and 4-deoxypyridoxine in mice and photosensitive baboons, and different modes of inhibition of cerebral glutamic acid decarboxylase
Brit. J. Pharmacol. 49: 52-63 (1973)

ITO, T., HORI, M., YOSHIDA, K. and SHIMIZU, M.:

Effect of anticonvulsants on seizures developing in the course of daily administration of pentetrazol to rats
Europ. J. Pharmacol. 45: 165-172 (1977)

KAPLAN, H. and MIEZEJESKI, Ch.:

Development of seizures in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*)
J. comp. physiol. Psychol. 81: 267-273 (1972)

KAPLAN, H.:

What triggers seizures in the gerbil, *Meriones unguiculatus*
Life Sci. 17: 693-698 (1975)

KILLAM, E.K. and SURIA, A.:

Antiepileptic drugs. Benzodiazepines
In: Antiepileptic drugs: mechanisms of action ed. by G.H. Glaser, J.K. Penry and D.M. Woodbury
Raven Press, New York 1980, pp 597-615

KRALL, R.L., PENRY, J.K., WHITE, B.G., KUPFERBERG, H.J. and SWINYARD, E.A.:

Antiepileptic drug development: II. Anticonvulsant drug screening
Epilepsia 19: 409-428 (1978)

KUPFERBERG, H.J.:

Antiepileptic drugs. Sodium valproate
In: Antiepileptic drugs: mechanisms of action
ed. by G.H. Glaser, J.K. Penry and D.M. Woodbury
Raven Press, New York 1980, pp 643-654

KURTZ, P. and PALFAI, T.:

State-dependent learning produced by metrazol
Physiol. Behav. 10: 91-95 (1973)

LAL, H., MANN JR., P.A., SHEARMAN, G.T. and LIPPA, A.S.:

Effect of acute and chronic pentylenetetrazol treat-
ment on benzodiazepine and cholinergic receptor
binding in rat brain
Europ. J. Pharmacol. 75: 115-119 (1981)

LITCHFIELD, J.T. and WILCOXON, F.:

A simplified method of evaluating dose-effect
experiments
J. Pharmacol. exp. Ther. 96: 99-113 (1949)

LÜSCHER, W. and FREY, H.-H.:

Effect of convulsant and anticonvulsant agents
on level and metabolism of γ -aminobutyric acid
in mouse brain
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 296: 263-269
(1977)

LÜSCHER, W. and ESENWEIN, H.:

Pharmacokinetics of sodium valproate in dog and
mouse
Arzneimittel-Forsch. 28: 782-787 (1978)

LÖSCHER, W.:

3-mercaptopropionic acid: convulsant properties, effects on enzymes of the γ -aminobutyrate system in mouse brain and antagonism by certain anti-convulsant drugs, aminooxyacetic acid and gabaculine

Biochem. Pharmacol. 28: 1397-1407 (1979)

LÖSCHER, W.:

A comparative study of the pharmacology of inhibitors of GABA-metabolism

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 315: 119-128 (1980)

LOSKOTA, W.J., LOMAX, P. and RICH, S.T.:

The gerbil as a model for the study of epilepsy: seizure habituation and seizure patterns
Proc. West. Pharmacol. Soc. 15: 189-194 (1972)

LOSKOTA, W.J. and LOMAX, P.:

The Mongolian gerbil as an animal model for the study of the epilepsies: anticonvulsant screening
Proc. West. Pharmacol. Soc. 17: 40-45 (1974)

LOSKOTA, W.J., LOMAX, P. and RICH, S.T.:

The gerbil as a model for the study of the epilepsies
Epilepsia 15: 109-119 (1974)

LOSKOTA, W.J. and LOMAX, P.:

The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as a model for the study of the epilepsies: EEG records of seizures
Electroenceph. clin. Neurophysiol. 38: 597-604 (1975)

MASON, Ch.R. and COOPER, R.M.:

A permanent change in convulsive threshold in normal and brain-damaged rats with repeated small doses of pentylenetetrazol
Epilepsia 13: 663-674 (1972)

MATTHES, A.:

Epilepsie: Diagnostik und Therapie für Klinik
und Praxis

Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1977

MATTSON, R.H.:

Other antiepileptic drugs. The benzodiazepines
In: Antiepileptic drugs

ed. by D.M. Woodbury, J.K. Penry and R.P. Schmidt
Raven Press, New York 1972, pp 497-516

MEYER, H. and FREY, H.-H.:

Dependence of anticonvulsant drug action on
central monoamines

Neuropharmacology 12: 939-947 (1973)

NOEBELS, J.L.:

Analysis of inherited epilepsy using single locus
mutations in mice

Fed. Proc. 38: 2405-2410 (1979)

NOEBELS, J.L. and SIDMAN, R.L.:

Inherited epilepsy: spike-wave and focal motor
seizures in the mutant mouse tottering

Science 204: 1334-1336 (1979)

NUTT, D.J., COWEN, P.J., BATTIS, C.C., GRAHAME-SMITH, D.G. and
GREEN, A.R.:

Repeated administration of subconvulsant doses of
GABA antagonist drugs. I. Effect on seizure
threshold (kindling)

Psychopharmacology 76: 84-87 (1982)

PINEL, J.P.J. and CHEUNG, K.F.:

Controlled demonstration of metrazol kindling

Pharmacol. Biochem. Behav. 6: 599-600 (1977)

SCHONFELD, A.R. and GLICK, S.D.:

Neuropharmacological analysis of handling-induced
seizures in gerbils

Neuropharmacology 19: 1009-1016 (1980)

STONE, W.E.:

Systemic chemical convulsants and metabolic derangements

In: Experimental models of epilepsy - a manual for the laboratory worker

ed. by D.P. Purpura, J.K. Penry, D.B. Tower, D.M. Woodbury and R.D. Walter

Raven Press, Publishers, New York 1972, pp 407-432

STONE, W.E. and JAVID, M.J.:

Quantitative evaluation of the actions of anti-convulsants against different chemical convulsants
Arch. int. Pharmacodyn. 240: 66-78 (1979)

SWINYARD, E.A., BROWN, W.C. and GOODMAN, L.S.:

Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats

J. Pharmacol. exp. Ther. 106: 319-330 (1952)

SWINYARD, E.A.:

Laboratory evaluation of antiepileptic drugs

Review of laboratory methods

Epilepsia 10: 107-119 (1969)

SYAPIN, P.J. and RICKMAN, D.W.:

Benzodiazepine receptor increase following repeated pentylenetetrazol injections

Europ. J. Pharmacol. 72: 117-120 (1981)

VINCENT, A.L., RODRICK, G.E. and SODEMAN JR., W.A.:

The pathology of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): a review

Lab. Anim. Sci. 29: 645-651 (1979)

VOSS, E., HASKELL, A.R. and GARTENBERG, L.:

Reduction of tetramine toxicity by sedatives and anticonvulsants

J. pharm. Sci. 50: 858-860 (1961)

WOODBURY, D.M.:

Applications to drug evaluations

In: Experimental models of epilepsy - a manual
for the laboratory worker

ed. by D.P. Purpura, J.K. Penry, D.B. Tower,
D.M. Woodbury and R.D. Walter

Raven Press, Publishers, New York 1972, pp 557-583

WOODBURY, D.M.:

Convulsants. Convulsant drugs: mechanisms of action

In: Antiepileptic drugs: mechanisms of action

ed. by G.H. Glaser, J.K. Penry and D.M. Woodbury

Raven Press, New York 1980, pp 249-303

YONEKAWA, W.D., KUPFERBERG, H.J. and WOODBURY, D.M.:

Relationship between pentylenetetrazol-induced

seizures and brain pentylenetetrazol levels in mice

J. Pharmacol. exp. Ther. 214: 589-593 (1980)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H.-H. Frey für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, sein Interesse am Fortgang der experimentellen Untersuchungen, seine freundliche Unterstützung und Beratung, seine vielen wertvollen Hinweise sowie für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. W. Löscher, Herrn Dr. A. Fitzek und Herrn Dr. R. Reiche für viele Anregungen und die mir gewährte Hilfe.

Allen Mitarbeitern des Laboratoriums danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und ihr freundliches Entgegenkommen.

Frau Dr. S. Klomburg danke ich für die Bereitstellung der Tottering-Mäuse.

Lebenslauf

30.01.1955	geboren in Berlin
April 1961 bis	
März 1967	Besuch der 7. Grundschule in Berlin-Steglitz
März 1967 bis	
Mai 1968	Besuch der Hermann-Ehlers-Oberschule in Berlin-Steglitz
August 1968 bis	
November 1972	Besuch der Malvina High School, Ryde, N.S.W., Australien
10.04.1973	Higher School Certificate (Abitur)
Januar 1973 bis	
Mai 1974	Besuch des Nordseegymnasiums, St. Peter
31.05.1974	Abitur in St. Peter
Oktober 1974	Beginn des Studiums der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
08.05.1980	Staatsexamen
23.05.1980	Approbation als Tierarzt
Seit August 1980	am Laboratorium für Veterinärpharmakologie Arbeit an der vorgelegten Dissertation
17.08.1981 bis	
31.03.1982	am Laboratorium für Veterinärpharmakologie als Teilzeit-MTA angestellt

